

**Molekularbiologische und mikroskopische
Untersuchungen am Pathosystem
Diplocarpon rosae Wolf (Sternrusstau) - Rose**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Gartenbauwissenschaften im Fachbereich Gartenbau
der Universität Hannover

Genehmigte Dissertation

von
Oliver Blechert

2005

Referent: Prof. Dr. Debener
Koreferent: Prof. Dr. Grunewaldt
Tag der Promotion: 14.02.2005

Zusammenfassung

Rosen sind allseits bekannte Pflanzen, mit großer kommerzieller sowie kultureller Bedeutung. Im Bereich der Schnittblumen wurden z.B. im Jahr 2001 Rosen für etwa 200 Millionen Euro nach Deutschland eingeführt, was einer Stückzahl von etwa 1 Milliarde Trieben entspricht.

Die Rosenkulturen werden häufig von dem Parasiten *Diplocarpon rosae*, zu deutsch Sternrusstau, befallen und geschädigt, so dass der Parasit jährlich große finanzielle Schäden verursacht. Durch die gezielte Auswahl von resistenten Rosen kann der Schaden durch Parasiten minimiert werden. Um Basismaterial und Daten für eine gezieltere Resistenzzüchtung zu erhalten, wurde die Interaktion zwischen Rosen und Sternrusstau untersucht.

Es wurden morphologische und histologische Untersuchungen an 81 Wildrosengenotypen durchgeführt, um die Frage zu klären, in welchen Genotypen Resistenzmechanismen vorkommen. Dazu wurden Blätter mit Konidien suspensionen inokuliert und 7 Tage später mit der KOH-Anilinblau-Methode angefärbt und mittels der Epifluoreszenzmikroskopie untersucht und dokumentiert. Bei 34 Genotypen wurden starke Resistenzen und bei 21 schwache Resistenzen gegen alle getesteten Sternrusstauisolate festgestellt. Anhand der histologischen Befunde wurde das Besiedlungsmuster des Sternrusstaus in sieben Gruppen unterteilt, die auf verschiedene Resistenzmechanismen zurückzuführen sind.

Da der Ausgang der Interaktion nicht nur vom Rosengenotyp sondern häufig auch vom Erregertyp des Sternrusstaus beeinflusst wird, wurden Untersuchungen zur Rassenstruktur und Diversität des Erregers durchgeführt. Dazu wurden sternrusstauspezifische Primer, basierend auf Mikrosatellitenloci, entwickelt und zu populationsgenetischen Untersuchungen genutzt. Es wurde eine genomische Phagenbank angelegt und nach Mikrosatellitenloci mit der Blottechnik und radioaktiv markierten Sonden gesucht. Es konnte von 54 unterschiedlichen Mikrosatellitenloci die Sequenzen ermittelt und 33 Primerpaare entworfen werden.

Anschließend wurde mit einer neu entwickelten Methode, bei der die DNA durch zerquetschen der Konidien zwischen zwei Objektträgern aufgeschlossen wird, Freilandproben untersucht. Der Vorteil in der Methode liegt in der schnellen Bearbeitung einer großen Probenzahl. Beim Vergleich von drei Sternrusstau populationen wurden Unterschiede im Grad der Diversität festgestellt. Zwei Populationen zeigen niedrige Diversität, während eine Population eine höhere Diversität aufweist.

An Hand der Mikrosatellitenmarker konnten 8 Gruppen von Erregern unterschieden werden, was auf einen relativ niedrigen Polymorphiegrad zwischen den einzelnen Sternrusstaustämmen schließen lässt. Um die niedrige Diversität zwischen den Stämmen zu verifizieren wurden zwei weitere Techniken angewendet: Die AFLP und die rDNA-Methode.

Mit der AFLP-Methode ließen sich alle untersuchten Stämme unterscheiden und wiesen einen Polymorphiegrad zwischen 0,031 und 0,315 auf. Nur der Stamm '101', mit dem die genomische Bank aufgebaut wurde, zeigte Polymorphiegrade zwischen 0,879 und 0,867 zu den anderen Sternrusstaustämmen. Somit wurde ein höherer Polymorphiegrad mit der AFLP-Methode gemessen, als es die Mikrosatellitenanalyse vermuten ließ. Der Grund für den niedrigen gemessenen Polymorphiegrad bei der Mikrosatellitenanalyse wurde in der großen genetischen Distanz des Stammes '101' zu den anderen Stämmen gesehen. Die Primer binden optimal an die DNA des Stammes '101', allerdings auf Grund der hohen Spezifität nicht in allen Fällen an die DNA anderer Sternrusstaustämmen.

Um zu klären, ob der Stamm '101' zu *D. rosae* gehört oder ob es sich um eine andere Art handelt, wurden von 10 *D. rosae*-Stämmen sowie von drei weiteren *Diplocarpon*-Arten Bereiche der rDNA sequenziert und die Daten verrechnet. Dabei zeigte sich, dass der Stamm '101' eine ähnlich hohe genetische Distanz zu den anderen Sternrusstaustämmen aufweist, wie die drei anderen *Diplocarpon*-Arten. Die Frage, ob es sich nun um eine eigene Art, um eine Unterart von *D. rosae* oder aber um eine Hybride aus zwei Arten handelt, bleibt ungeklärt. Die Einordnung des Stammes '101' in die Gattung *Diplocarpon* ist aber zweifelsfrei.

Mit den Sequenzen der Taxa aus der Gattung *Diplocarpon* sowie mit in Datenbanken verfügbaren Sequenzen, konnte außerdem eine Einordnung der Gattung *Diplocarpon* in das natürliche System vorgenommen werden. Nahe Verwandte wurden in der Gattung *Ramulispora* und *Pyrenopeziza* gefunden, die wie der Sternrusstau in die Familie der Dermateaceae eingeordnet werden.

Schlagworte: *Diplocarpon rosae*, *Rosa* spp., Interaktion

Summary

Roses are universally known plants of great commercial and cultural importance. With regard to cut flowers roses for about € 200 million, equivalent to one billion shoots, were imported into Germany in 2001.

Roses are often infested and thus impaired by the parasite *Diplocarpon rosae*, known as "Black Spot" (German: "Sternrusstau"), which annually causes great financial damages. By controlled selection of resistant roses the damages caused by the pathogens can be minimized. In order to get basic material and data for a controlled resistance breeding the interactions between roses and black spot were examined.

Morphological and histological investigations were conducted with 81 wild rose genotypes to detect mechanisms of resistance. For that purpose, leaves were inoculated with suspensions of conidia and seven days later examined by means of epifluorescence microscopy after leaf tissue was stained with the KOH-aniline blue method. Strong resistance against all tested black spot isolates was found in 34 genotypes, weak resistance only in 21 genotypes.

On the basis of histological findings the colonization pattern of black spot was subdivided into seven groups, which can be explained by its different resistance mechanisms.

As the findings were not only influenced by the rose genotype but the type of pathogen as well, tests about the race structure and diversity of the pathogen were done. For that reason, black spot specific primers based on microsatellite loci were designed and used for population genetic analysis.

A genomic phage bank was set up and 54 microsatellite loci were screened with the help of a blot technique and radioactively labelled probes. As a result 33 primer pairs were designed.

Field samples were analysed by means of a newly developed method, where DNA was released from spores after squeezing conidia between microscopes slides, which allows a rapid examination of a great number of samples.

Three black spot populations were compared and differences found up to the degree of diversity. Two populations showed a low diversity and only in one population a higher diversity was found. With the help of microsatellite markers eight pathogen groups could be differentiated which points to a relatively low degree of polymorphism among individual black spot strains.

Summary

To verify the low diversity among the pathogen strains two additional techniques were applied: the AFLP and the rDNA method. With AFLP all analysed strains could be differentiated and the degree of polymorphism was in a range of 0.031 to 0.315. Only strain '101', the genotype from which the genomic bank for the microsatellite analyses was designed, showed a degree of polymorphism between 0.879 and 0.867 when compared to the other black spot strains. Thus the AFLP method led to a higher degree of polymorphism as expected by the microsatellite method. The lower degree of polymorphism with the microsatellite method was explained by the vast genetic distance between strain '101' and the other black spot strains. The developed primers bind optimally to the DNA of strain '101', but as a result of their high specificity not in all cases to the DNA of the other black spot strains.

To decide whether strain '101' belongs to the genus *D. rosae* or whether it is a different species the sequences of parts of the rDNA from ten *D. rosae* strains and three other *Diplocarpon* species were analysed and the data set off.

The results demonstrate the vast genetic distance between strain '101' and the other investigated black spot strains and similar to the other three *Diplocarpon* species.

The question whether strain '101' is a species of its own or a subspecies of *D. rosae* or a hybrid of two species could not be answered. However, without any doubt strain '101' belongs to the genus *Diplocarpon*. Moreover, a classification of the genus *Diplocarpon* belonging to the natural system was possible by means of sequences of the taxon *Diplocarpon* and sequences available in data banks. A close relationship was found between strain '101' and members of the genus *Ramulispora* and *Pyrenopeziza*, which are belonging like black spot to the family of the Dermataceae.

Key words: *Diplocarpon rosae*, *Rosa* spp., interaction

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. DIE GATTUNG <i>ROSA</i> UND DEREN ÖKONOMISCHER STELLENWERT IM PFLANZENBAU	1
1.2. DIE ROSE UND DIE EINORDNUNG IN DAS REICH DER PFLANZEN.....	3
1.3. DER STERNRUSSTAU UND DIE EINORDNUNG IN DAS REICH DER PILZE	5
1.4. DIE INTERAKTION ZWISCHEN STERNRUSSTAU UND ROSEN.....	7
1.5. ZIELSETZUNG	8
2. MATERIAL UND METHODEN.....	10
2.1. VERWENDETES PFLANZENMATERIAL.....	10
2.2. VERWENDETES PILZMATERIAL.....	12
2.2.1. Verwendete Pilzstämme.....	12
2.2.2. Anlage axenischer Pilzkulturen aus infiziertem Blattmaterial.....	13
2.2.3. Vermehrung und Konservierung der Einsporisolate	13
2.3. MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN DER INTERAKTION.....	14
2.3.1. Inokulation von Rosenblättern mit <i>D. rosae</i>	14
2.3.2. Mikroskopische Untersuchungen der Interaktion.....	14
2.4. MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DES ERREGERS	15
2.4.1. DNA-Isolierung aus axenischen Pilzkulturen.....	15
2.4.2. Entwicklung, Testung und Anwendung von Mikrosatellitenmarkern	15
2.4.2.1. Herstellung einer primären DNA-Bank von <i>D. rosae</i>	15
2.4.2.2. Hybridisierung der Phagenbank gegen Mikrosatellitenmotive	17
2.4.2.3. Umwandlung der positiv getesteten Phagen in Phagmide	18
2.4.2.4. Aufreinigung der Plasmide für die Sequenzreaktion.....	18
2.4.2.5. Sequenzierung der Inserts zur Ermittlung der Basenabfolge	19
2.4.2.6. Screening nach Mikrosatelliten anhand der Basenabfolge.....	20
2.4.2.7. Testung der Primer und die Suche nach Polymorphismen.....	20
2.4.2.8. Mikrosatellitenanalyse von <i>D. rosae</i> mit DNA aus axenischer Kultur	21
2.4.3. AFLP-Analyse	22
2.4.4. Sequenzierung und Analyse von Bereichen der rDNA.....	24
2.4.4.1. Amplifikation der rDNA-Region.....	25

2.4.4.2. Klonierung der rDNA-Fragmente in <i>E. coli</i>	26
2.4.4.3. Sequenzierung	26
2.4.4.4. Analyse der rDNA-Sequenzen.....	27
3. ERGEBNISSE	28
3.1. MORPHOLOGISCHE UND HISTOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DES PATHOSYSTEM	
<i>DIPLOCARPON ROSAE</i> - <i>ROSA</i> SPP.	28
3.1.1. Neue Einsporkulturen von <i>D. rosae</i>	28
3.1.2. Besiedlungsstärke von <i>D. rosae</i> auf verschiedenen Rosengenotypen.....	30
3.1.3. Morphologie und Zellformen des Erregers	34
3.1.4. Besiedlungsformen des Erregers in Abhängigkeit vom Wirtsgenotyp	40
3.2. MOLEKULARBIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DES PATHOGENS <i>DIPLOCARPON ROSAE</i>	
.....	42
3.2.1. Mikrosatellitenmarker für <i>D. rosae</i>	42
3.2.2. DNA-Bank	42
3.2.3. Amplifikation und Screening der Bank.....	42
3.2.4. Sequenzierung der Klone	43
3.2.5. Herstellung der Primer.....	45
3.2.6. Primertestung	46
3.2.7. Diversitätsanalyse von <i>D. rosae</i> aus axenischer Kultur.....	50
3.2.8. Diversitätsanalyse von <i>D. rosae</i> aus inokulierten Blättern.....	51
3.2.9. Diversitätsanalyse von <i>D. rosae</i> aus natürlich befallenen Blättern	52
3.2.10. <i>D. rosae</i> mit auffälligem Bandenmuster.....	55
3.2.11. Populationsstruktur von <i>Diplocarpon rosae</i>	57
3.3. MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN <i>DIPLOCARPON</i>	59
3.3.1. Übertragbarkeit der Mikrosatellitenmarker auf andere <i>Diplocarpon</i> -Arten.....	59
3.3.2. AFLP-Analyse von <i>Diplocarpon</i> auf Art- und Gattungsebene.....	61
3.3.3. Analyse der rDNA zur Ermittlung der Diversität von <i>D. rosae</i> sowie der Phylogenie der Gattung <i>Diplocarpon</i>	66
3.3.4. Variationen im Bereich der rDNA bei <i>Diplocarpon</i>	66
3.3.5. Diversität von <i>D. rosae</i> und intragenerische Verwandtschaft ermittelt mit Hilfe der rDNA-Analyse	67
3.3.6. Einordnung der Gattung <i>Diplocarpon</i> in die Ordnung <i>Helotiales</i>	69

3.3.7. Verwandtschaft von <i>Diplocarpon</i> auf der Ebene der Familie der <i>Dermateaceae</i>	72
4. DISKUSSION	74
4.1. ERSCHLIEßUNG NEUER RESISTENZQUELLEN GEGEN DEN STERNRUSSTAUBEFALL	74
4.1.1. Inokulation und Dokumentation	74
4.1.2. Resistenzmechanismen verschiedener Rosengenotypen gegen den Sternrusstaubeffall	76
4.1.2.1. Passive Resistenzmechanismen	76
4.1.2.2. aktive Resistenzmechanismen	78
4.1.3. Resistenzen gegen verschiedene Erregerstämme	80
4.2. DIVERSITÄTS- UND PHYLOGENETISCHE ANALYSEN MITTELS MIKROSATELLITEN- UND AFLP-MARKERN, SOWIE SEQUENZEN VON rDNA-BEREICHEN	81
4.2.1. Mikrosatelliten	82
4.2.1.1. Aufbau der genomischen DNA-Bank	82
4.2.1.2. Verbreitung und Häufigkeit von Mikrosatelliten im Genom	84
4.2.1.3. Primertestung	85
4.2.1.4. Konidienaufschlußmethoden	85
4.2.1.5. Populationsstudien	87
4.2.1.6. Anwendung der Mikrosatellitenmarker	87
4.2.2. AFLP	88
4.2.3. rDNA	91
4.2.3.1. rDNA im Genom von <i>D. rosae</i>	91
4.2.3.1. Einordnung der Gattung <i>Diplocarpon</i>	92
4.2.4. Risikofaktor von <i>Diplocarpon rosae</i> und deren Bedeutung für die Resistenzzüchtung	93
5. LITERATUR	96
6. ANHANG	101
6.1 SOFTWARE	101
6.2 DATENBANKEN UND KULTURSAMMLUNGEN	101
6.3. LÖSUNGEN UND MEDIEN	101

6.3.1. Nährmedien	101
6.3.2. Färbelösungen	103
6.3.3. Elektrophoresegele.....	103
6.3.4. Puffer und andere Lösungen	105
6.3.5. Plasmidpräparation.....	106
6.3.6. Hybridisierung	106
6.4. PRIMER	107
6.5. SEQUENZ-ALIGNMENT DES rDNA-BEREICHES VERSCHIEDENER STÄMME DER GATTUNG <i>DIPLOCARPON</i>	108

1. Einleitung

1.1. Die Gattung *Rosa* und deren ökonomischer Stellenwert im Pflanzenbau

Rosen sind allseits bekannte Pflanzen. Sie haben eine große kulturelle und symbolische Bedeutung und werden in mannigfaltiger Weise verwendet. Rosen werden als Schnittblumen angebaut, in Gärten und Parks angepflanzt, als Miniaturrosen zur Dekoration in Innenräumen verwendet und in der Landschaftspflege eingesetzt, z.B. als Hecken und als Dünenschutz an der Nordsee. Außerdem kommt den Rosen noch eine geringe Bedeutung als Nahrungsmittel für den Menschen, als Heilmittel, sowie als Futter für Weidetiere zu (SHISHKIN & YUZEPCHUK 1941). Eine besondere Erwähnung verdient auch die Produktion von ätherischen Ölen in der Parfümindustrie.

Die ökonomisch bedeutendste Stellung nehmen die Schnittrosen ein. In der BRD wurden im Jahr 2001 Schnittrosen im Wert von über 200 Millionen Euro eingeführt. Dieses entspricht einer Stückzahl von fast einer Milliarde Schnittrosen bzw. nahezu 35.000 Tonnen (siehe Tabelle 1.1), während nur 47 Millionen Schnittrosen exportiert wurden.

Tabelle 1.1: Deutscher Im- und Export von Schnittrosen

	Jahr	Euro	Stückzahl	kg
Schnittrosen Import	2001	207.111.000	916.475.000	34.971.000
Schnittrosen Export	2001	10.516.000	47.626.000	2.070.000

Quelle: basierend auf HEINRICHS (2002)

Der Großteil des Anbaus findet in südlichen Ländern der Erde statt. Besonders in Afrikanischen Ländern, z.B. in Kenia (auf 1.000 ha) und in Südamerika, z.B. Ecuador (2.000 ha) und Kolumbien (1.000 ha), werden Schnittrosen in großem Maßstab produziert und exportiert (BLOM und TSUJITA 2003). Auf Grund von klimatischen Vorteilen, unbedarfterem Umgang mit Fungi- sowie Insektiziden und niedrigeren Lohnkosten ist der Anbau dort wesentlich kostengünstiger zu bewerkstelligen.

Ein Teil des Qualitätsmanagements sowie die Züchtung neuer Rosensorten finden in den Industrienationen statt. Die Sorten werden dann in den Entwicklungsländern angebaut und per Luftfracht zu den Abnehmern in den Industrienationen gebracht.

Während die Schnittrosenproduktion für den heimischen Markt größtenteils im Ausland stattfindet, sieht die Situation bei Gartenrosen anders aus. Diese werden auf einer Gesamtfläche von immerhin fast 43.000 ha in heimischen Betrieben produziert (siehe Tabelle 1.2). Der Anbau erfolgt dabei zum Großteil im Freiland (KARLIK et al. 2003). Zuerst wird dafür ein Feld mit den Veredlungsunterlagen vorbereitet. Im Sommer werden dann die gewünschten Rosen auf die Unterlagen okuliert. Die Pflanzen stehen dann mindestens ein Jahr auf dem Feld, bevor diese geerntet werden können. Anschließend werden diese direkt verkauft oder bis zur nächsten Vegetationsperiode im Kühlhaus eingelagert. Der Verkauf erfolgt als wurzelnackte Ware oder als Containerpflanzen. In den letzten Jahren setzte sich, bedingt durch ein verändertes Kaufverhalten der Endverbraucher, der Trend zu Containerware durch. Gerade bei Containerpflanzen kann der Endkunde sehr schnell den Gesundheitszustand der Ware einschätzen und wird sich vornehmlich für schädlings- und krankheitserregerfreie Rosen entscheiden. Insofern stellt der Sternrusstau nicht nur einen entscheidenden Faktor bei der Produktion der Rosen da, sondern beeinflusst auch unmittelbar das Kaufverhalten der Endverbraucher.

Tabelle 1.2: Anbaufläche von Rosen in Deutschland

	Jahr	ha
Rosenveredlungen gesamt	2000	18.331
Heckenrosen und Kletterpflanzen	2000	6.243
Stämme	2000	453
Buschrosen	2000	4.941
Polyantharosen	2000	4.843
Bodendecker	2000	5.068
Zwergrosen	2000	683
Kletter- und Parkrosen	2000	2.343
Rosenunterlagen gesamt	2000	30.772
Edelcanina	2000	14.213
Rosa laxa	2000	15.136
Rosa multiflora	2000	1.424
Schnittrosen Anbaufläche offen	2000	189
Schnittrosen Anbaufläche unter Glass	1992	241

Quelle: basierend auf HEINRICHS (2002)

1.2. Die Rose und die Einordnung in das Reich der Pflanzen

Rezent existieren etwa 200 Wildrosenarten. Das natürliche Verbreitungsgebiet umfasst den gemäßigten bis subtropischen Gürtel der nördlichen Hemisphäre mit dem Schwerpunkt im zentralasiatischen Raum bis hin nach China.

Die ältesten Rosenfunde stammen aus Florissant in Colorado. Dort wurden aus 37 Millionen Jahre alten Sedimentgestein fossile Blattabdrücke entdeckt, die sich der Gattung *Rosa* zuordnen lassen (MACGINITIE 1953). Diese Abdrücke weisen große Ähnlichkeiten mit der noch heute in Nordamerika lebenden *Rosa palustris* auf und werden der fossilen Art *Rosa hilliae* zugeordnet.

Rosen gehören zu den Zweikeimblättrigen Pflanzen und FROHNE & JENSEN (1998) ordnet diese wie in Tabelle 1.1 angegeben in das natürliche Pflanzenreich ein:

Tabelle 1.1: Einordnung der Gattung *Rosa* in das Pflanzenreich

Abteilung	Spermatophyta
Unterabteilung	Magnoliophytina
Klasse	Rosopsida
Ordnung	Rosales
Familie	Rosaceae
Unterfamilie	Rosoideae
Gattung	<i>Rosa</i>

Quelle: basierend auf FROHNE & JENSEN (1998)

Innerhalb der Gattung *Rosa* werden vier Untergattungen unterschieden (WISSEMANN 2003):

- subgenus *Hulthemia*

Hulthemia ist eine monotypische Untergattung mit der Art *Rosa persica*

- subgenus *Platyrhodon*

ebenfalls eine monotypische Untergattung mit der Art *R. roxburghii*

- subgenus *Hesperhodos*

aus der Untergattung *Hesperhodos* sind zwei Art aus Nordamerika bekannt: *R. stellata* und *R. minutifolia*

- subgenus *Rosa*

die Untergattung Rosa wird in 10 Sektionen unterteilt:

- Pimpinellifoliae
- Rosa
- Caninae
- Carolinae
- Cinnamomeae
- Synstylae
- Indicae
- Banksianae
- Laevigatae
- Bracteatae

Die Einteilung der Wildrosen wird, soweit bekannt, nach der Systematik vorgenommen. Dem gegenüber steht die Einteilung der Kulturosen.

Für deren Klassifikation stehen verschiedene Kriterien zur Verfügung, so dass je nach Gewichtung der Kriterien unterschiedliche Einteilungen möglich sind. Im Jahr 2000 hat die ARS (American Rose Society) auf dem zwölften ‚World Rose Convention‘ in Texas einen Standard festgelegt (CAIRNS 2003). Danach werden die Rosen in drei Großgruppen unterteilt:

- Wildarten
- Alte Gartenrosen
- Moderne Rosen

Zu den alten Gartenrosen werden Sorten gezählt, die bereits vor der Einführung von der ersten Tee-Hybride ‚La France‘ im Jahre 1867 existierten. Zu den Alten Gartenrosen zählen die Gruppen Alba, Bourbon, Centifolia, Damaszena, Chinarosen und Tee-Rosen.

Als Moderne Rosen werden Sorten bezeichnet, die nach dieser Zeit entstanden sind. Die weitere Einteilung der Modernen Rosen erfolgt nach morphologischen Merkmalen, insbesondere der Wuchsform. Unterschieden werden die Gruppen Floribunda, Polyantha, Tee-Hybriden, Grandiflora, Kletterrosen, Strauchrosen und Miniaturrosen.

1.3. Der Sternrusstau und die Einordnung in das Reich der Pilze

Der Sternrusstau, im englischen ‚black spot‘ genannt, wird durch einen auf die Gattung *Rosa* beschränkten hemibiotrophen Blattparasiten hervorgerufen. Obwohl der Befall mit Sternrusstau schon lange bekannt und der Pilz weit verbreitet ist, wurde erst 1912 die sexuelle Fortpflanzung bei diesem Organismus bekannt. Anhand der teleomorphen Strukturen konnte WOLF (1912) den Sternrusstau den Askomyzeten zuordnen und einen wissenschaftlichen Namen vergeben: *Diplocarpon rosae* Wolf.

Damit verloren andere, geläufige Bezeichnungen für den Sternrusstau ihre Gültigkeit und sollten nicht mehr verwendet werden, wie z.B. *Marssonina rosae*, *Asteroma rosae*, *Actinonema rosae* und *Marsonia rosae* (ARONESCU 1934).

Der Sternrusstau wird in die Familie der Dermateaceae eingeordnet (siehe Tabelle 1.4), wobei diese Familie sehr heterogen ist und der heutige Kenntnisstand eine abschließende Darstellung der natürlichen Verwandtschaftsverhältnisse nicht zulässt (NAUTA und SPOONER 1999).

Tabelle 1.4: Einordnung von *Diplocarpon rosae* in das natürliche System.

Reich	Eumykota
Abteilung	Askomykota
Ordnung	Leotiales
Familie	Dermateaceae
Gattung	<i>Diplocarpon</i>

Quelle: basierend auf HAWKSWORTH et al. (1995)

Nach HAWKSWORTH et al. (1995) gehören in die Gattung *Diplocarpon* 6 Arten.

Alle leben parasitisch an Pflanzen, wobei vornehmlich Wirte aus der Familie der Rosaceae besiedelt werden. Als Wirte sind die Gattungen *Fragaria* und *Potentilla* (für *Diplocarpon earlianum*), *Crataegus* und *Mespilus* (*D. mespili*) und *Malus* (*D. mali*) bekannt.

Die Art *D. rosae* ist von anderen Erregern an Rosen gut abgegrenzt und auch im Feld leicht zu erkennen. *D. rosae* verursacht an den Rosen ein sehr charakteristisches Schadbild, das im fortgeschrittenen Stadium nicht mit dem anderer Schaderreger zu verwechselt ist (PROLL et al. 2002).

Während die Abgrenzung zu anderen Pilzarten leicht fällt, ist eine intraspezifische Unterteilung auf Grund von fehlenden morphologischen Differenzierungsmerkmalen schwierig. Um dennoch eine Einteilung vorzunehmen, müssen andere Kriterien herangezogen werden. Eine Möglichkeit besteht darin, den Sternrusstau in verschiedene

physiologische Rassen einzuteilen (SVEJDA und BOLTON 1980) oder es kann eine Unterteilung des Taxon nach molekularen Merkmalen vorgenommen werden.

Durch phytopathologische Arbeiten ist bekannt, dass vom Sternrusstau mehrere physiologische Rassen entstanden sind, die sich durch unterschiedliche Präferenzen des Wirtsgenotyps unterscheiden (WENEFRIIDA und SPENCER 1993).

JENKINS (1954) verglich 22 Mischisolate vom Sternrusstau und konnte 14 verschiedene pathogene Rassen unterscheiden. Damit wurde eine sehr hohe Variabilität bezüglich der Wirtsspezifität festgestellt.

Auch in Untersuchungen mit monoklonalen Stämmen wurden unterschiedliche physiologische Rassen festgestellt. DEBENER et al. (1998) konnten durch ein Testsortiment mit 10 Rosengenotypen 5 verschiedene physiologische Sternrusstau-Rassen beschreiben, wobei die Autoren es für sehr wahrscheinlich halten, dass wesentlich mehr physiologische Rassen existieren.

Die Unterteilung in physiologische Rassen ist ein wichtiges Werkzeug in der Resistenzforschung, um z.B. monogen vererbte Resistenzmechanismen nach den Gen-für-Gen Modell nach FLOR (1947) zu untersuchen.

Eine weitere Möglichkeit der Unterteilung des Taxon *D. rosae* erlaubt die sich rasch entwickelnde DNA-Markertechnik. Dabei werden Unterschiede sowie Gemeinsamkeiten zwischen verschiedenen Sternrusstaustämmen auf DNA-Basis evaluiert.

Während mehrere Untersuchungen zur Rassenbildung auf physiologischer Ebene durchgeführt wurden, waren Untersuchungen zur genetischen Variabilität nur spärlich vorhanden und reproduzierbare molekulare Marker für eine Unterteilung der Art *D. rosae* fehlten vollkommen. Nur SCHULT (1994) untersuchte mittels der RAPD-Markertechnik den Sternrusstau und konnte Variationen auf DNA-Basis zwischen verschiedenen Isolaten feststellen.

1.4. Die Interaktion zwischen Sternrusstau und Rosen

In den meisten Rosenkulturen ist der Befall mit Sternrusstau allgegenwärtig und die Beeinträchtigung für die Rosen erheblich. Dementsprechend bezeichnet HORST (1989) den Sternrusstau als den weltweit gefährlichsten Erreger für die Rosen.

Im mitteleuropäischen Freiland fallen die ersten Schadsymptome an den Rosen meist ab Juni auf. Die Krankheit beginnt mit nekrotischen Flecken auf den Laubblättern, die einen Durchmesser von 3 cm erreichen können. Diese Flecken sind meist stark verbräunt und von einem chlorotischen Hof umgeben. Der Rand der Nekrosen ist unregelmäßig und durch sternförmig ausstrahlende Verbräunung sehr charakteristisch gestaltet. Zentral können die Bildungsorte der Konidien, auch Azervuli genannt, mit einer Handlupe als etwa 0,5 mm große, weiße Erhebungen erkannt werden (PROLL et al. 2002).

Ein weiteres typisches Merkmal ist die starke Entlaubung der Pflanzen. Durch das Fortschreiten der Erkrankung von den bodennahen zu den apikalen Blättern entsteht ein Schadbild, das häufig schon aus größerer Entfernung wahrgenommen werden kann.

Eine Neuinfektion mit Sternrusstau geschieht über die Konidien, wobei deren Verbreitung mittels Wasser geschieht (HORST 1989). Bei starkem Regen lösen sich die Konidien von den Azervuli und werden durch aufspritzende Regentropfen verteilt. Kommen die Konidien in Kontakt mit neuen Blättern, so heften sie sich an diese und beginnen bei günstigen Bedingungen zu keimen. Günstige Bedingungen bedeuten dabei eine Temperatur zwischen 15-27°C, wobei für die Keimung 18°C und für das Wachstum 21°C optimal sind (FRICK 1943). Niedrige Temperaturen werden gut vertragen, hohe Temperaturen nur schlecht. Bereits ab einer Temperatur von 33°C sterben die Konidien ab. Neben der Temperatur spielt die Feuchtigkeit eine sehr entscheidende Rolle bei der Keimung, da sich die Konidien mindestens sieben Stunden in Wasser befinden müssen, bevor die Keimung einsetzen kann.

Nach 24 Stunden haben die ersten Konidien Keimschläuche mit Appressorien gebildet. Diese dringen durch die Kutikula in das Blatt und können nun eine neue Sternrusstau-Kolonie etablieren. Dazu verzweigen sich die Hyphen nach zwei Tagen und beginnen die Epidermiszellen zu penetrieren. Dabei senkt der Erreger Hyphen in das Innere von Epidermiszellen und bildet Haustorien aus (ARONESCU 1934). Am vierten Tag setzt eine verstärkte Wachstumsphase des Erregers ein, so dass sich der Sternrusstau im Blatt ausbreitet. Am fünften Tag sind makroskopisch die ersten Schadsymptome zu erkennen und gleichzeitig beginnt der Sternrusstau reproduktive Strukturen zu bilden. Dabei wird zwischen den Epidermiszellen und der Kutikula eine dichte Hyphenmatte angelegt an der

die Konidiogenese stattfinden. Am sechsten Tag haben sich etliche Konidien ausdifferenziert und durch deren Volumenzunahme wird die Kutikula angehoben bis diese schließlich aufreißt und die Konidien freigibt.

Dieses Szenarium setzt eine kompatible Interaktion zwischen *D. rosae* und dem Wirt voraus. Die Wechselwirkung zwischen dem Erreger und dem Wirt ist sehr komplex und nicht jeder Sternrusstaustamm ist in der Lage jede Rose zu befallen.

Verschiedene Rosen unterscheiden sich sehr stark in der Anfälligkeit, die von stark anfällig bis zu resistent variieren kann. Erschwerend bei der Analyse der Resistenz ist, dass auch der Erreger einen entscheidenden Einfluss auf die Interaktion ausüben kann. So ist z.B. *Rosa hybrida* 'Sommerwind' gegen den Befall der Sternrusstau-Rasse 2 resistent aber gegen die Rasse 5 anfällig. Genau umgekehrt verhält sich ein Genotyp von *R. rugosa* (DEBENER et al. 1998). Die Interaktion zwischen diesen Genotypen verhält sich nach dem Gen-für-Gen Modell von FLOR (1947)

1.5. Zielsetzung

Mit dieser Studie sollte die Interaktion von *Diplocarpon rosae* mit Rosen untersucht werden, um Basisdaten für wissenschaftliche Resistenzforschung sowie für die kommerzielle Resistenzzüchtung zu gewinnen.

Im ersten Abschnitt sollten die Resistenzeigenschaften von verschiedenen Wildrosengenotypen untersucht und aufgeklärt werden, ob verschiedene Resistenzmechanismen vorliegen und diese sich morphologisch und histologisch unterscheiden lassen.

Dazu wurden Unterschiede sowie Gemeinsamkeiten der Resistenzantworten verschiedener Wildrosen herausgearbeitet. Es sollten Resistenzmechanismen gefunden werden, die möglichst auf unterschiedlichen „Genen“ beruhen. Diese sollen in ein Kreuzungsprogramm aufgenommen werden, um resistente Zuchtlinien zu erhalten bzw. um eine genauere Charakterisierung der Resistenz vorzunehmen. Die Evaluierung verschiedener Resistenzgene erlaubt anschließend eine Kombination dieser Gene, um nachhaltig resistente Rosen zu züchten.

Die Untersuchungen wurden auf zellulärer Ebene durchgeführt und sowohl die Veränderungen an den befallenen Rosenzellen als auch die wirtsspezifischen Besiedlungsmuster an Hand der Sternrusstauausbildung dokumentiert.

Die Sternrusstau-Roseninteraktion hängt aber nicht nur vom Rosengenotyp ab, sondern wird auch entscheidend vom Erreger mitbestimmt. So kann ein Rosengenotyp gegenüber einem Sternrusstau Stamm resistent sein, während derselbe Rosengenotyp gegen einen anderen Sternrusstau Stamm anfällig ist.

Um diesen Faktor in zukünftigen Untersuchungen ausreichend berücksichtigen zu können, sollten Informationen zu der Diversität und der Populationsstruktur des Sternrusstaus erschlossen werden.

Dazu wurden Untersuchungen am Sternrusstau auf klonaler sowie auch auf Populationsebene vorgenommen. Einzelne Sternrusstau Stämme sollten molekular charakterisiert werden, um diese von anderen Stämmen reproduzierbar unterscheiden zu können. Die genetischen Unterschiede zwischen Sternrusstau Stämmen sollten quantifiziert werden, um Hinweise auf die Diversität und Populationsstruktur zu erhalten. Die Untersuchungen sollten mittels Mikrosatellitenmarkern vorgenommen werden. Um die Untersuchungen durchführen zu können, mussten im ersten Schritt geeignete Primerpaare und im zweiten Schritt eine Methode zur Untersuchung von Freilandproben entwickelt werden.

Bei der Analyse mit den Mikrosatellitenmarkern wurde ein niedriger Polymorphiegrad innerhalb der Sternrusstauisolate gemessen. Da nicht feststand, ob eine geringe Diversität beim Sternrusstau vorliegt oder ob dieses durch die Analysemethode vorgetäuscht wird, wurden weitere Analysen, mit AFLP-Markern sowie rDNA-Sequenzen durchgeführt. Dadurch konnten weitere Daten zur Diversität des Sternrusstaus erhalten werden, sowie eine Einordnung in die natürliche Verwandtschaft vorgenommen werden.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendetes Pflanzenmaterial

81 verschiedene Rosengenotypen wurden in die morphologischen und histologischen Untersuchungen der Interaktion einbezogen (siehe Tabelle 2.1). Die verwendeten Rosengenotypen stehen auf den Freilandversuchsfeldern des Instituts für Zierpflanzenzüchtung in Ahrensburg (IZZ) und sind zum Großteil im Jahr 1993 dort angepflanzt worden. Die gegen den Sternrusstau anfällige Kulturrose 'Pariser Charme' wurde in einer Klimakammer kultiviert, so dass stets kontaminationsfreies Blattmaterial zur Verfügung stand.

Tabelle 2.1: Verwendete Rosengenotypen

Rosenart	Feldnummer des IZZ	Untergattung bzw. Sektion *1	natürliche Verbreitung *1	Chromosomenzahl *1
<i>R. acicularis</i>	93-01-01	Cinnamomeae	circumpolar	28,42, 56
<i>R. agrestis</i>	93-02-01	Caninae	Europa,N-Afrika	35,42
<i>R. anemoniflora</i>	00-58-02	Synstylae	O-China	14
<i>R. arkansana</i>	00-54-03	Cinnamomeae	N-Amerika	14
<i>R. arvensis</i>	93-03-01	Synstylae	Europa,Türkei	14
<i>R. banksiae</i>	00-58-01	Banksianae	Z- und W-China	14
<i>R. bella</i>	00-31-01	Cinnamomeae	N-China	28
<i>R. bella</i>	00-57-04	Cinnamomeae	N-China	28
<i>R. blanda</i>	93-04-01	Cinnamomeae	N-Amerika	14
<i>R. britzensis</i>	93-05-01	Caninae	Kurdistan	35
<i>R. californica var. plena</i>	00-32-01	Cinnamomeae	Kultur	28
<i>R. californica var. plena</i>	00-33-01	Cinnamomeae	Kultur	28
<i>R. canina</i>	93-06-01	Caninae	Europa	35,42
<i>R. canina</i>	93-06-04	Caninae	Europa	35,42
<i>R. canina var. nervulosa</i>	00-33-02	Caninae	Europa	35,42
<i>R. canina 'Inermis'</i>	93-06-09	Caninae	Europa	35, 42
<i>R. carolina</i>	93-07-01	Carolinae	N-Amerika	28
<i>R. caudata</i>	94-103-02	Cinnamomeae	W-China	14,28
<i>R. chinensis</i>	00-57-03	Chinensis	China	14,21,28
<i>R. corymbifera 'Laxa'</i>	93-10-01	Caninae	Europa,N-Afrika	35,42
<i>R. damascena</i>	93-58-01	Gallicanae	Kleinasien	28
<i>R. foetida</i>	93-12-01	Pimpinellifoliae	Kleinasien	28
<i>R. foetida var. persiana</i>	93-14-02	Pimpinellifoliae	Kultur	28
<i>R. foliolosa</i>	93-15-01	Carolinae	N-Amerika	14
<i>R. gallica</i>	93-16-01	Gallicanae	Europa,Kleinasien	28
<i>R. helenae</i>	93-18-01	Synstylae	Z-China	14
<i>R. 'Hi 364'</i>	00-35-01	?	Himalaya	?
<i>R. hirtissima</i>	00-56-05	Caninae	Kaukasus	28
<i>R. hugonis</i>	93-19-01	Pimpinellifoliae	Z-China	14
<i>R. jundzillii</i>	93-22-01	Caninae	Europa, W-Asien	42
<i>R. kordesii</i>	93-20-01	Synstylae	Kultur	28
<i>R. longicuspis</i>	00-56-04	Synstylae	W-China	14

<i>R. lyellii</i>	00-37-01	Bracteatae	Indien, Burma	14
<i>R. macrophylla</i>	93-21-01	Cinnamomeae	Himalaya	14
<i>R. majalis</i>	93-09-01	Cinnamomeae	Europa	14,28
<i>R. majalis</i>	93-09-02	Cinnamomeae	Europa	14,28
<i>R. manca</i>	00-56-03	Cinnamomeae	N-Amerika	28
<i>R. mollis</i>	93-24-01	Caninae	Europa	28
<i>R. moschata</i>	00-56-02	Synstylae	Kleinasien	14
<i>R. moyesii</i>	93-25-04	Cinnamomeae	W-China	42
<i>R. multibracteata</i>	93-26-01	Cinnamomeae	W-China	28
<i>R. multiflora</i>	93-27-02	Synstylae	Japan, Korea	14
<i>R. multiflora</i> var. <i>watsoniana</i>	00-38-01	Synstylae	Kultur	14
<i>R. multiflora</i> x <i>wichuraiana</i>	00-38-02	Hybride	Kultur	14
<i>R. nanothamnus</i>	00-56-01	Cinnamomeae	Himalaja	14
<i>R. nitida</i>	93-29-01	Carolinae	N-Amerika	14
<i>R. nutkana</i>	93-30-01	Cinnamomeae	N-Amerika	28
<i>R. obtusifolia</i>	93-31-01	Caninae	Europa	35
<i>R. omeiensis</i>	93-39-01	Pimpinellifoliae	Z-China	14
<i>R. hybrida</i> 'Patrizia'	00-39-01	Hybride	Kultur	14
<i>R. pendulina</i>	93-32-02	Cinnamomeae	Europa	28
<i>R. pendulina</i> X <i>spinosissima</i>	00-40-01	Hybride	Kultur	28
<i>R. pendulina</i> X <i>spinosissima</i> var. <i>lageroides</i>	00-40-03	Hybride	Kultur	28
<i>R. pisocarpa</i>	93-33-01	Cinnamomeae	N-Amerika	14,21
<i>R. pomifera</i> var. <i>engadinensis</i>	00-55-07	Caninae	Europa	28
<i>R. pomifera</i> var. <i>typica</i>	00-55-06	Caninae	Europa	28
<i>R. prattii</i>	00-55-05	Cinnamomeae	W-China	14
<i>R. primula</i>	00-55-04	Pimpinellifoliae	Z-Asien, N-China	14
<i>R. rugosa</i> var. <i>regeliana</i>	93-36-04	Cinnamomeae	China, Japan, Korea	14
<i>R. roxburghii</i>	93-35-02	Platyrrhodon	China	14
<i>R. rubiginosa</i>	93-11-01	Caninae	Europa, Kleinasien	35,42
<i>R. rubiginosa</i>	93-11-06	Caninae	Europa, Kleinasien	35,42
<i>R. rubrifolia</i>	93-17-06	Caninae	S-Europa	28
<i>R. rubus</i>	00-55-03	Synstylae	China	14
<i>R. sancta</i>	00-57-05	Gallicanae	Äthiopien	21
<i>R. serafinii</i>	00-55-01	Caninae	S-Europa	35
<i>R. setigera</i> var. <i>serena</i>	00-47-02	Synstylae	N-Amerika	14
<i>R. spinosissima</i>	93-42-01	Pimpinellifoliae	Europa, Kleinasien	28
<i>R. suffulta</i>	00-54-04	Cinnamomeae	N-Amerika	28
<i>R. sweginzowii</i> var. <i>macrocarpa</i>	93-45-01	Cinnamomeae	NW-China	42
<i>R. texarkana</i>	00-53-07	Carolinae	N-Amerika	28
<i>R. tomentosa</i>	93-46-01	Caninae	Europa, Kleinasien	35
<i>R. villosa</i>	93-24-03	Caninae	Europa, Kleinasien	28
<i>R. virginiana</i>	00-42-02	Carolinae	N-Amerika	28
<i>R. virginiana</i>	93-47-02	Carolinae	N-Amerika	28
<i>R. vosagiaca</i>	93-98-01	Caninae	Europa	35,42
<i>R. webbiana</i>	00-53-06	Cinnamomeae	Himalaja	14
<i>R. wichuraiana</i>	93-99-01	Synstylae	O-Asien	14
<i>R. woodsii</i>	93-49-01	Cinnamomeae	N-Amerika	14
<i>R. xanthina</i> var. <i>spontanea</i>	00-53-05	Pimpinellifoliae	N-China	14
<i>R. zalana</i>	00-53-04	Caninae	Europa	35,42
<i>R. hybrida</i> 'Pariser Charme'		Hybride	Kultur	28

* modifiziert nach KRÜSSMANN (1986).

2.2. Verwendetes Pilzmaterial

2.2.1. Verwendete Pilzstämmen

Die verwendeten Pilzstämmen sind in den Tabellen 2.2.-2.3. aufgeführt. Die Stämme der Art *D. rosae* (Tabelle 2.2) wurden als Einsporisolate angelegt und in DREVES-ALVAREZ (1992) und DEBENER et al. (1998) phytopathologisch beschrieben. Die Stämme wurden bei -20°C auf Blattmaterial der Sorte 'Pariser Charme' gelagert.

Die drei anderen *Diplocarpon*-Arten (Tabelle 2.3) wurden von der CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures in Holland) bzw. NBRC (Biological Resource Center in Japan) erworben.

Tabelle 2.2: Verwendete Pilzstämmen: *D. rosae*-Einsporkulturen, charakterisiert von DREVES-ALVAREZ (1992) und DEBENER et al. (1998)

Pilzstamm	Herkunft
7001 E4	Ahrensburg
7701 E1	Ahrensburg
91-100-5 E10	Ahrensburg
Dort E4	Dortmund
DüA3	Düsseldorf
Elina E4	Ahrensburg
Elv 13	Ahrensburg
Feu 7	Ahrensburg
Reg III-1	Regensburg
Slyd 2	Sparrieshoop
Spa A1	Sparrieshoop

Tabelle 2.3: Verwendete Pilzstämmen: weitere *Diplocarpon*-Arten

Pilzstamm	Herkunft
<i>Diplocarpon earlianum</i>	CBS 162.32
<i>Diplocarpon mali</i>	NBRC 30405
<i>Diplocarpon mespili</i>	CBS 166.28

Neben diesen Pilzstämmen wurden weitere *D. rosae*-Isolate wie folgt angelegt und in die Untersuchungen mit einbezogen.

2.2.2. Anlage axenischer Pilzkulturen aus infiziertem Blattmaterial

Um neue, monoklonale *D. rosae* Stämme zu erhalten, wurden Proben aus dem Freiland aufgereinigt. Es wurde infiziertes Blattmaterial gesammelt und aus einzelnen Sporen axenische Kulturen angelegt.

Im ersten Schritt wurde eine Oberflächendesinfektion des gesammelten Blattmaterials durchgeführt. Einzelne Fiederblättchen wurden für 5 min in 0,5% NaOCl geschwenkt. Anschließend wurden die Blättchen in sterilem Leitungswasser gewaschen und unter der Werkbank getrocknet.

Unter dem Binokular wurden einzelne voll entwickelte Azervuli mit noch unbeschädigter Kutikula herausgesucht. Mittels steriler Nadeln wurden die Azervuli geöffnet und die Konidien gewonnen. Diese wurden anschließend auf MOM-Nährmedium (siehe Anhang 6.3.1) ausgestrichen. Die Kulturen wurden bei 25°C inkubiert. Nach etwa 50 Tagen waren die Kolonien voll ausgebildet und neue Konidien hatten sich gebildet. Diese Verbreitungseinheiten wurden mit sterilem Wasser abgeschwemmt und anschließend mit dem Drigalski-Spatel auf neues Nährmedium ausplattiert.

Nach einer Inkubationszeit von 2 Wochen wurden einzelne Kolonien auf neuen Nährboden überführt und bis zum Einsetzen der Konidiogenese inkubiert. Die Konidien wurden erneut ausplattiert, um sicher zu stellen, dass monoklonale Stämme vorliegen.

Nicht sporulierende Kulturen konnten zum Teil durch einen Wechsel auf Biomalzmedium zur Konidiogenese angeregt werden.

2.2.3. Vermehrung und Konservierung der Einsporisolate

Die monoklonalen Stämme wurden kryokonserviert, um die Stämme langfristig zu erhalten. Dazu wurden Konidien und Myzelfragmente von der Petrischale abgeschwemmt und auf sterile Filterscheiben getropft. Diese wurden in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C kryokonserviert.

Parallel dazu wurde der Erreger auf Blattmaterial zurückgeführt. Dazu wurden mit einem Teil der Lösung Blätter der Rose 'Pariser Charme' infiziert. Nach dem erfolgreichen Anwachsen und der Ausbildung neuer Konidien wurden diese entweder für weitere Vermehrungsschritte verwendet oder für spätere Inokulationen samt Blattmaterial bei -20°C konserviert.

2.3. Mikroskopische Untersuchungen der Interaktion

2.3.1. Inokulation von Rosenblättern mit *D. rosae*

Für die Untersuchungen wurden junge, aber bereits entfaltete Fiederblätter gesammelt (KNIGHT und WHEELER 1978a). Diese wurden vorsichtig, ohne die Blätter zu beschädigen (YOKOYA et al. 2000), von der Pflanze abgelöst, gewaschen und anschließend in eine Feuchtekammer überführt.

Die so vorbereiteten Blätter wurden mit der Tropfeninokulation behandelt. Dazu wurden Konidien von infiziertem Blattmaterial mit sterilem Wasser abgeschwemmt und gesammelt. Um eine Uniformität zwischen den verschiedenen Inokulationsansätzen zu erreichen, wurde die Konzentration jeweils auf 100000 vitale Konidien pro ml Inokulum eingestellt. Die Vitalitätsbestimmung wurde mit einem Aliquot der Konidienlösung in 0,005% Phenosafranin durchgeführt (WIEGAND 2001).

Inokuliert wurde mit jeweils 10 µl Suspension, welches auf die adaxiale Seite der ausgelegten Fiederblättchen gegeben wurde. Nach einer 48 stündigen Inkubation in der Feuchtekammer bei Raumtemperatur und diffusem Licht, wurden die Inokulationstropfen abgetrocknet und die Blätter weitere 5 Tage inkubiert.

2.3.2. Mikroskopische Untersuchungen der Interaktion

Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden 7 Tage nach der Inokulation mit einer Rasierklinge je 5 Blattscheiben herausgetrennt und für 15 min in einer 1 M KOH-Lösung bei 115°C im Tischautoklaven geklärt. Nach zweimaligem Waschen mit Aqua bidest. wurden die Proben in einer Anilinblau-Färbelösung (HOOD & SHEW 1996) angefärbt.

Die anschließende Betrachtung erfolgte mit einem Zeiss Epifluoreszenz-Mikroskop (Anregungsfilter: 450-490 nm, Dichromatischer Teiler 510 nm, Sperrfilter 520 nm).

Blatt-Querschnitte von befallenen Blättern wurden von Hand mit einer Rasierklinge durchgeführt. Die Schnitte wurden kurz in die Baumwollblau-Färbelösung (siehe Anhang 6.3.2) getaucht und zweimal mit Aqua bidest. gespült.

Die adaxiale Oberfläche von befallenen Blättern wurde mit dem Rasterelektronenmikroskop (Philips XL 30 ESEM W), am Institut für Resistenzforschung und Pathogendiagnostik in Aschersleben, betrachtet.

2.4. Molekularbiologische Untersuchung des Erregers

2.4.1. DNA-Isolierung aus axenischen Pilzkulturen

Als Ausgangsmaterial für die DNA-Isolierung wurden Flüssigkulturen mit Myzel von Einsporisolen inokuliert und etwa 30 Tage bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Die entstandenen Myzelbällchen wurden abfiltriert und in flüssigem Stickstoff im Mörser zerkleinert. Im noch gefrorenen Zustand wurde 5 ml CTAB-Lösung (CUBERO et al. 1999) und 3 µl RNase-Lösung (10 mg/ml) pro 1 g Pilzmyzel hinzu gegeben und bei 65°C für 20 min inkubiert.

Die Lösung wurde mit 1 Volumen Phenol/Chloroform (1:1) und anschließender Chloroformextraktion gereinigt. Anschließend wurde die DNA mit 1 Volumen Isopropanol (100%) und 150 mM Natriumacetat gefällt und einmal mit 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen der Pellets wurden diese in Puffer AP1, aus dem Qiagen DNeasy Plant-Extraktionskit, gelöst und nach der Anleitung von Qiagen weiterverarbeitet. Die Elution der DNA wurde mit 2x 50 µl Elutionspuffer durchgeführt.

Alternativ wurde die DNA von auf Nährboden gezogenem Myzel gewonnen. Dazu wurde 100 mg Myzel mit möglichst wenig Nährbodenresten in flüssigen Stickstoff eingefroren und in einer Zelmühle mit zwei Stahlkugeln aufgeschlossen. Noch im schockgefrorenen Zustand wurden 400 µl AP 1 zugegeben und die DNA wie in der Qiagenanleitung extrahiert.

2.4.2. Entwicklung, Testung und Anwendung von Mikrosatellitenmarkern

2.4.2.1. Herstellung einer primären DNA-Bank von *D. rosae*

Für die Entwicklung von Mikrosatelliten-Primer wurde im ersten Schritt eine DNA-Bank hergestellt. Dazu wurde 1 µg genomische DNA von *D. rosae* '101' mit Eco R1 für 8 h bei 37°C verdaut:

50 µl DNA-Lösung (mit 20 µg DNA pro µl TE-Puffer)

20 µl 10X Reaktionspuffer von Gibco

10 µl Eco R1-Enzym (10U/µl von Gibco)

120 µl Aqua bidest.

Nach einer Fällung mit Isopropanol und einer Waschung mit 70% Ethanol wurde die DNA in 50 µl TE-Lösung resuspendiert und auf einem Agarosegel aufgetrennt.

Mit einem sauberen Skalpell wurden die Fragmente mit einer Länge von 500 bis 1500 Basenpaare (bp) herausgetrennt. Die DNA wurde mit den Invisorb DNA Extraktionskit (Invitek GmbH) aus der Agarose herausgelöst und nach einer Isopropanol-Natriumacetat Fällung und anschließender Ethanol-Waschung in 5 µl TE-Puffer aufgenommen.

Diese Fragmente wurden in den Lambda Zap Vektor („Lambda Zap II Predigested Eco R1/CIAP-Treated Vector Kit“ von Stratagene) ligiert.

Angesetzt wurde:

2,5 µl DNA-TE-Lösung

1,0 µl Lambda ZAP II predigested Vector

0,5 µl 10X Ligase-Puffer

0,5 µl 10 mM rATP

2 µl T4 DNA Ligase (1 U/µl von Gibco)

Die Reaktion wurde für 8 h bei 4°C inkubiert.

Nachdem die DNA-Fragmente in den Vektor eingebaut worden ist, erfolgte die Verpackung des Vektors mit den Phagen-Hüllproteinen (ebenfalls von Stratagene). Dazu wurde der Verpackungsextrakt, der bei -80°C gelagert wurde, bis zum Schmelzpunkt angetaut und 1 µl der Ligationslösung vorsichtig zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurde die Lösung für 90 min bei 22°C inkubiert. Anschließend wurden 500 µl SM-Puffer und 20 µl Chloroform zugegeben.

Nachdem eine Phagenbank angelegt worden war, wurde die Anzahl der Klone in der primären Bank bestimmt und anschließend die Klone vermehrt.

Da die Phagen nicht in der Lage sind sich autonom zu vermehren, musste die Vermehrung mit dem Wirt, *E. coli*, vorgenommen werden. Dazu wurde eine Flüssigkultur von *E. coli* (XL1-Blue MRF-Klone) angelegt. Als Nährlösung wurde 50 ml Maltose-MgSO₄-LB-Lösung verwendet. Die Kultur wurde auf dem Schüttler 16 h bei 37°C inkubiert, bis die Bakterienkultur eine optische Dichte von 0,6 bis 1 (bei OD₆₀₀) erreicht hatte. Die Kultur wurde pelletiert und in 10 mM MgSO₄ resuspendiert. Die Dichte der Zellen wurde auf 0,6 bei einer OD₆₀₀ eingestellt.

Zum Ausplattieren der Phagen wurden 200 µl der Bakterienlösung in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Hierzu wurden 100 µl der Phagensuspension gegeben, kurz geschüttelt und bei 37°C für 15 min inkubiert. Die so vorbereitete Lösung wurde in 3 ml flüssigem 48°C warmen Top-Agar gegeben. Die Lösung wurde kurz geschüttelt und auf eine auf 37°C vorgewärmte Petrischale mit NZY-Lösung (mit 15 g Agar) gegossen. Durch

leichtes Schwenken der Schale wurde der Top-Agar gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt. Anschließend wurde die Kultur bei 37°C inkubiert.

Nach 16 h war ein Bakterienrasen zu erkennen. In diesem Bakterienrasen waren einige helle Flecken, sogenannte Plaques, vorhanden. Hier hatten die Phagen erfolgreich den *E. coli* Wirt besiedelt und dessen Lyse induziert. Zur Titerbestimmung wurden die Plaques in einer Verdünnungsreihe ausgezählt und die Konzentration der pfu (Plaque forming units) pro ml bestimmt.

Für die Amplifikation der Phagen-Bank wurden die Petrischalen mit 10 ml SM-Puffer überschichtet, für 12 h bei 4°C inkubiert, und die Pufferlösung abgezogen.

Nach Zugabe von Chloroform bis zu einer Endkonzentration von 5%, wurden die Zellreste abzentrifugiert und der Überstand abgenommen und aliquotiert.

Es wurde 0,3% Chloroform und 7% DMSO zugegeben und anschließend bei -80°C gelagert.

2.4.2.2. Hybridisierung der Phagenbank gegen Mikrosatellitenmotive

In den nächsten Schritten wurde die Phagen-Bank nach Klonen durchsucht, die Inserts, DNA-Abschnitte von *D. rosae*, mit sich wiederholenden Motive enthalten. Dazu wurden ca. 5000 Phagen pro Petrischale, wie oben angegeben, ausplattiert. Nach der Wachstumsphase von 16 h bei 37°C wurden die Petrischalen bei 5°C für 2 h inkubiert. Anschließend wurde vorsichtig eine Nitrozellulosemembran (Hybond-N) aufgelegt, um die Phagenpartikel an die Membran zu binden. Nach 2 min wurde die Membran wieder abgenommen, denaturiert, neutralisiert und anschließend gewaschen.

Denaturiert wurde für 2 min mit einer Denaturierungslösung (siehe Anhang). Anschließend wurde für 5 min neutralisiert und die Membran für 30 sec mit der Waschlösung gereinigt. Abschließend wurde die Membran durch eine zweistündige Inkubation bei 80°C getrocknet.

Nachdem die DNA aus der Phagenkultur an die Membran gebunden war, wurde mittels Hybridisierung nach Phagenklonen gesucht, die Mikrosatellitenmotive enthalten. Dazu wurde die Membran für 6 h bei 55°C in 5x SSPE, 5x Denhardts, 0,1% SDS und 100 ng denaturierter *E.coli*-DNA vorhybridisiert.

Parallel dazu wurde die Hybridisierungslösung vorbereitet. Als Hybridisierungspuffer wurde 5x SSPE, 5x Denhardts, 0,1% SDS und endmarkierte Oligonukleotide verwendet. Eingesetzt wurden 30 Basen lange Oligonukleotide mit den sich wiederholenden Motiven AAC, AAG, AT, AAT, CA oder GA. Die Markierung wurde mit radioaktivem ATP

durchgeführt und zwar mit 0,4 μM Oligonukleotid, 1x forward Puffer (BRL), 50 μCi γ -dATP, 10 U T4-Kinase im Gesamtansatz von 25 μl . Nach 15 min Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 μl 0,5 M EDTA gestoppt und die Oligonukleotide mit Sephadex-G50 aufgereinigt.

Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 55°C mit den Motiven AAC, AAG, CA, GA bzw. bei 45°C mit den Motiven AT, AAT. Am nächsten Tag wurden die Membranen 3x für 30 min bei 25°C mit 6x SSC und 0.1% SDS gewaschen und anschließend einmal für 5 min bei 45°C für die Motive AAC, AAG, CA, GA bzw. 35°C für die Motive AT, AAT. Zur Autoradiographie wurden die Membranen auf Kodak X-O-Mat Filmen über Nacht bei -80°C gelagert. Nach der Zuordnung der Signale des Auto-Radiogramms zu den Kolonien auf den Petrischalen, wurden die Plaques mit positiven Signalen selektiert und in 500 μl SM Puffer mit 20 μl Chloroform gegeben.

2.4.2.3. Umwandlung der positiv getesteten Phagen in Phagemide

Diese Phagen wurden mittels „Helfer Phagen“ und *E. coli* 'SolR' in Phagemide mit zirkulären Plasmiden umgewandelt. Dazu wurden 200 μl *E. coli*-Lösung ‚XL-1 Blue MRF‘ mit 250 μl der Phagenlösung und 1 μl ‚ExAssist helper phage‘ Lösung gemischt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml LB-Nährlösung und einer Inkubation von 3 h bei 37°C wurde die Probe für 20 min auf 70°C erhitzt und anschließend abzentrifugiert. 10 μl des Überstandes wurden in 200 μl 10 mM MgSO_4 mit *E. coli* ‚SOLR‘ (Konzentration 1 bei OD_{600}) gegeben, 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf LB-Ampicillin ausplattiert. Je selektierter Ausgangskolonie wurden 8 monoklonale Kolonien vereinzelt und in 96iger Mikrotiterplatten in LB-Flüssigmedium hochvermehrt. Es folgte eine zweite Hybridisierungsrunde mit den phagemidhaltigen *E. coli*-Klonen. Kolonien, die auch in der zweiten Hybridisierungsrunde positive Signale ergaben, wurden für den nächsten Schritt, die Sequenzierung, selektiert.

2.4.2.4. Aufreinigung der Plasmide für die Sequenzreaktion

Für die Sequenzierung der klonierten Inserts wurden die einzelnen *E. coli*-Klone hochvermehrt, mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen und die Plasmide aufgereinigt. Mit den gewonnenen Plasmiden wurde im Anschluss die Sequenzreaktion durchgeführt.

Um die Plasmide zu isolieren, wurden jeweils 5 ml LB-Ampicillin-Medium mit dem selektierten *E. coli*-Stämmen beimpft. Nach einer Inkubation im Schüttler für 12 h bei 37°C

wurden die Zellen abzentrifugiert. Die plasmidiäre DNA der pelletierten Zellen wurden mittels alkalischer Lyse, modifiziert nach SAMBROOK und RUSSELL (2001) aufgereinigt. Dazu wurden die *E. coli*-Zellen in 200 µl Lösung 1 (siehe Anhang) resuspendiert. Nach Zugabe 400 µl Lösung 2 und vorsichtigem Mischen wurde diese für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde vorsichtig 300 µl eiskalte Lösung 3 zugegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und die DNA mit 1 Volumen 100% Isopropanol für 15 min bei Raumtemperatur gefällt. Nach zweimaligem Waschen mit 70% Ethanol und anschließendem kurzen Trocknen des Pellets wurde dieses in 400 µl TE mit 1,5 µl RNase-Lösung (siehe Anhang) gelöst und für 60 min bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Phenol/Chloroform- und zwei Chloroformextraktionen. Nach erneuerter Fällung der DNA und zweimaligem Waschen mit Ethanol wurden die aufgereinigten Plasmide in Aqua bidest. gelöst und konnten für die anschließende Sequenzierung verwendet werden.

2.4.2.5. Sequenzierung der Inserts zur Ermittlung der Basenabfolge

Die Sequenzreaktion (mit dem Sequenzierkit von Amershan) wurde durchgeführt mit 0,08 pM Primer M13 for-N700 (siehe Anhang), 0,08 pM Primer M13 rev-N800, 12% DMSO, 50 Volumenprozent des A, C, G, bzw. T-Mixes und 100 ng Plasmid-DNA.

PCR-Reaktionsansatz	PCR-Reaktion		
1 µl DNA-Lösung (100 ng DNA)	1x	95°C	2'
0,15 µl Primer M13 uni-N700 (2 µM)	30x	95°C	15''
0,15 µl Primer M13 rev-N800 (2 µM)		50°C	30''
0,46 µl DMSO		65°C	90''
0,24 µl Aqua. bidest.	1x	72°C	10'
2 µl A, C, G bzw. T-Mix			

Auf Grund der kleinen Reaktionsvolumina von 4 µl je Reaktion wurden diese mit je 1 µl Mineralöl als Verdunstungsschutz überschichtet und anschließend die PCR-Reaktion durchgeführt. Nach Zugabe von 4 µl Ladepuffer wurden 0,7 µl der Proben auf einem Sequenziergel in der Licor-Sequenzieranlage aufgetrennt.

Anschließend wurden die Sequenzen mit der Sequenziersoftware Image Analysis (Version 4.1h) ausgelesen. Ein sogenanntes Alignment wurde mit der Software Clustalx (Version 1.8) und Bioedit (Version 5.0.9) durchgeführt und mit Hilfe der scf-File visualisierenden Software Trev (Version 1.6) aus den Staden Softwarepaket manuell korrigiert.

2.4.2.6. Screening nach Mikrosatelliten anhand der Basenabfolge

Nachdem die Sequenzen der Inserts bekannt waren, wurden diese auf das Vorhandensein von Mikrosatellitenmotiven überprüft. Dazu wurde auf den Gelbildern und den Sequenzen visuell, sowie mit dem Programm Tandem Repeats Finder, mit den Parametern: 2, 7, 7, 80, 10, 30, 500 nach repetitive Sequenzabschnitten gesucht.

Sequenzen mit solchen Motiven wurden in eine lokale Blast-Datenbank (Bioedit Version 5.0.9) überführt. Mittels der Datenbank wurden die einzelnen Sequenzen miteinander verglichen. Doppelte Sequenzen wurden anschließend verworfen.

Anschließend wurden mit der Software Oligo (Version 5.0) flankierend um die Mikrosatellitenmotive Primerpaare abgeleitet. Die Primer wurden von der Biotechnologiefirma MWG synthetisiert.

2.4.2.7. Testung der Primer und die Suche nach Polymorphismen

Die synthetisierten Primer wurden mit *Diplocarpon rosae*-DNA von Stamm '101' (Tab. 3.1) und mit Plasmid-DNA der Klone getestet. Dabei wurden verschiedene Reaktionsbedingungen, wie z.B. Variationen der Annealingtemperatur, getestet und optimiert.

Um Informationen über die Spezifität der Primerpaare zu erhalten, wurden PCR-Reaktionen mit Temperaturgradienten mit Rosen-DNA sowie mit mindestens zwei Sternrusstau-Stämmen durchgeführt. Die Proben wurden auf einem 3% Agarosegel aufgetrennt und die DNA-Fragmente mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Um eine höhere Auflösung in der Auftrennung der Fragmente zu erreichen, wurden einzelne Proben auf denaturierende Polyacrylamidgele mit anschließender Silberfärbung aufgetragen. Dazu wurden zwei Glasplatten mit Isopropanol (70%) und Chloroform gereinigt. Die vordere Scheibe wurde mit Repellentsilan (siehe Anhang) behandelt, während auf die hintere Methacryloxypropyltrimethoxysilane aufgetragen wurde. Anschließend wurde das Acrylamid-Gel gegossen. Nach einer Aushärtungsphase von 30 Minuten wurde das Gel in eine Gelstation eingehängt. Als Puffer und Elektrolyt-Lösung wurde 1xTBE verwendet. Nach einer Vorlaufzeit von 20 Minuten wurden die Proben aufgetragen und für 10 h bei 1500 Volt aufgetrennt. Anschließend wurden die Banden mittels der Silberfärbung visualisiert.

Dazu wurde das Gel in die Stopplösung gelegt und unter Schütteln inkubiert, bis der Farbstoff des Ladepuffers nicht mehr sichtbar war. Nach zweimaligen waschen mit Aqua

bidest. wurde das Gel für 45 min unter Schütteln in der Färbelösung inkubiert und anschließend noch einmal gewaschen. Das Gel wurde in die Entwicklerlösung gegeben bis die Banden sichtbar wurden. Anschließend wurde die Stopplösung zugegeben und für 2 min inkubiert. Das Gel wurde für 5 min in Aqua. bidest. gewaschen, getrocknet und anschließend durch Digitalfotos dokumentiert.

Nach Auswertung der Daten wurden 8 Primerpaare ausgewählt. Von diesen wurden die reversen Primer mit Fluoreszenzfarbstoff synthetisiert, so dass deren PCR-Produkte auf Polyacrylamidgelen aufgetrennt und in der Licor-Sequenzieranlage detektiert werden konnten. Die PCR-Bedingungen wurden auf die markierten Primer optimiert.

2.4.2.8. Mikrosatellitenanalyse von *D. rosae* mit DNA aus axenischer Kultur

Von 19 *D. rosae*-Einsporkulturen wurde (wie oben angegeben) DNA isoliert. Die anschließenden PCR-Reaktionen wurde mit 10 µl Reaktionsvolumen wie folgt durchgeführt:

PCR-Reaktionsansatz	PCR-Reaktion		
1 µl DNA-Lösung (10 ng DNA)	1x	95°C	1'
0,5 µl Primer MDr a (5 µM)	35x	95°C	1'
0,5 µl Primer MDr b-800 (5 µM)		45-65°C	1'
0,5 µl dNTPs (2 mM)		72°C	1'
1 µl PCR-Puffer (Invitrogen)	1x	72°C	2'
0,3 µl MgCl (50mM)			
5,6 µl Aqua. bidest.			
0,1 µl Tag-Polymerase (10U/µl) *			

* die Enzyme stammen von der Firma Invitrogen, wenn nicht anders angegeben

Es wurde 20 µl Ladepuffer zugegeben. Vor dem Auftragen auf das Polyacrylamidgel im Licor-Sequenzier wurde die Probe für 5' bei 72°C denaturiert.

Parallel zu den Proben lief eine DNA-Leiter (350 bp-Leiter von Licor) mit, um die Länge der PCR-Fragmente bestimmen zu können. Die Analyse der Gelbilder sowie die Längenbestimmung der PCR-Produkt-Fragmente erfolgte mit der Programm Labimage (Version 2.62).

2.4.3. AFLP-Analyse

Die AFLP-Analyse erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Vos et al. (1995). Es wurden die 10 *D. rosae*-Stämme '101', '117', '120', '121', '123', '128', '140', '141', '142', '152' (siehe Tabelle 3.1) sowie *D. earlianum* und *D. mespili* mit dieser Technik untersucht. Im ersten Schritt wurde DNA von den 12 Pilzstämmen für den Restriktionsverdau vorbereitet. Dazu wurde die in TE-Puffer gelöste DNA mit Isopropanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen, in Aqua bidest. resuspendiert und die DNA-Konzentration ermittelt. Im anschließenden Restriktionsverdau wurden jeweils 100 ng DNA eingesetzt.

Restriktionsverdau:

DNA-Lösung	3 µl
RL-Puffer (10x)	2,5 µl
HindIII (10U/µl)	0,6 µl
MseI (10U/µl)	0,25 µl
Aqua bidest.	18,65 µl

Die Restriktionsansätze wurden durch behutsames Auf- und Abpipetieren gemischt und über Nacht bei 37°C vollständig verdaut. Am nächsten Morgen wurden die Adapter an die DNA-Fragmente ligiert. Je Reaktionsansatz wurde 5 µl Ligationslösung verwendet und mit dem Restriktionsverdau vermischt.

Ligationsansatz:

HindIII Adapter (HindIII O + U)	0.5 µl
MseI Adapter (MseI O + U)	0.5 µl
ATP (10 mM)	0.6 µl
RL Buffer (10x)	0.5 µl
T ₄ -DNA-Ligase (5 U/µl)	0.05 µl
Aqua bidest.	2.85 µl

Es folgte eine Inkubation von 3,5 h bei 37 °C.

Nach der Ligation wurde 5 µl für den Reaktionsansatz der Präamplifikation verwendet. Die folgende PCR-Reaktion wurde mit 20 Zyklen durchgeführt.

Präamplifikationsansatz		PCR-Reaktion		
Ligationslösung	5 µl	20x	94°C	30''
Primer HindIII (50 ng/µl)	1,5 µl		60°C	30''
Primer MseI (50ng/µl)	1,5 µl		72°C	60''
dNTPs (2 mM)	5 µl			
Williamspuffer (10x)	5 µl			
Aqua bidest.	31 µl			
Taq-Polymerase (5U/µl)	1 µl			

Nach der Präamplifikation wurde die Lösung auf 5% mit Aqua bidest verdünnt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die Endreaktion wurde wie folgt angesetzt und mit der Touchdown-Methode im Thermocycler amplifiziert:

Reaktionsansatz:

verdünnte Präamplifikation	2,5 µl
HindIII-Primer (2ng/µl fluoreszenzmarkiert)	2,5 µl
MseI-Primer (50 ng/µl)	0,3µl
dNTPs (2mM)	1 µl
Williamspuffer (10x)	1 µl
Aqua bidest.	2,15 µl
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,05 µl

Reaktionszyklen:

12x	94°C	30''
	65 (-0,75°C pro Zyklus)	30''
	72°C	1'
24x	94°C	30''
	56°C	30''
	72°C	1'

Je Pilzstamm wurde die PCR-Reaktion mit 13 verschiedenen Primerkombinationen durchgeführt (siehe Tabelle 2.4).

Tabelle 2.4: Verwendete Primerkombinationen für die AFLP-Analyse:

Primerkombination*1	selektive Basen des HindIII-Primer	selektive Basen des MseI-Primer
1	CAC	CTG
2	CGA	GTG
3	CAG	CGA
4	CGA	CGA
5	CAG	GGT
6	CGA	GGT
7	CAG	TGT
8	CGA	TGT
9	CGA	GTG
10	AAT	AAT
11	CGT	AAT
12	AAT	ACT
13	CGT	ACT

*1 vollständige Primersequenz im Anhang 6.4

Nach der PCR-Reaktion wurden 20 µl Ladepuffer zugegeben und die Proben für 10' bei 72 °C denaturiert.

Parallel dazu wurde ein Polyacrylamidgel für den Licor-Sequencer (DNA Analyzer Gene ReadIR 4200 Dual Dye von Licor Biosciences in Bad Homburg) vorbereitet. Es wurde jeweils 0,5 µl der Proben aufgetragen und zur Vereinfachung der Auswertung lief jeweils eine DNA-Leiter (350 bp-Leiter von Licor) mit. Die gewonnenen Gelbilder wurden mit der Software Labimage (Version 2.62) ausgewertet und manuell kontrolliert.

Die Daten wurden in eine Excel-Tabelle eingefügt. Bei Anwesenheit einer Bande wurde eine 1 eingetragen und bei Abwesenheit einer Bande eine 0. Die Daten wurden mit der Software NTSYSpc (Version 2.10s) ausgewertet. Verwendet wurde die Routinen „simqual“ mit dem JACCARD (1908)-Index und „sahn“ mit der UPGMA-Clustering-Methode zur Erstellung eines Stammbaumes.

2.4.4. Sequenzierung und Analyse von Bereichen der rDNA

Um DNA-Sequenzdaten über die Phylogenie von *D. rosae* zu erlangen, wurde ein Bereich der rDNA-Region von verschiedenen *D. rosae*-Stämmen und drei weiteren *Diplocarpon*-Arten sequenziert. Dabei wurden zwei unterschiedliche Methoden angewendet:

1. die direkte Sequenzierung und

2. die Sequenzierung mit vorgeschalteter Klonierung von rDNA-Abschnitten in *Escherichia coli*.

2.4.4.1. Amplifikation der rDNA-Region

Für die direkte Sequenzierung wurde folgende PCR-Reaktion angesetzt:

PCR-Reaktionsansatz	PCR-Reaktion		
1 µl DNA-Lösung (50 ng DNA)	1x	95°C	1'
5 µl Primer NS 7 (5 µM)	30x	95°C	1'
5 µl Primer LS 266 (5 µM)		58°C	1'
5 µl dNTPs (2 mM)		72°C	1'
0,2 µl Tag-Polymerase (5 U/µl)	1x	72°C	10'
2,5 µl PCR-Puffer (10 x Williams-Puffer)			
6,3 µl Aqua. bidest.			

Die PCR-Reaktion wurde 1' bei 95°C initialisiert, anschließend 30 mal 95°C für 1', 58°C für 1' und 72°C für 1' amplifiziert und anschließend für 10' bei 72°C finalisiert. Es wurde 10% Ladepuffer zugegeben, die Proben auf Agarosegelen aufgetragen und in einer Elektrophoresekammer aufgetrennt. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mit einer Größe von etwa 1500 bp aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Gelextraktionskit von Invitex aufgereinigt. Diese PCR-Fragmente wurden in der anschließenden Sequenzreaktion eingesetzt.

Für die Sequenzierung der rDNA-Region mit dem Zwischenschritt der Klonierung in *E. coli* wurde folgende PCR-Reaktion angesetzt:

PCR-Reaktionsansatz	PCR-Reaktion		
1 µl DNA-Lösung (50 ng DNA)	1x	95°C	45''
5 µl Primer NS 7 (5 µM)	14x	94°C	45''
5 µl Primer LS 266 (5 µM)		63°C	45'' (-0,5°C pro Zyklus)
5 µl dNTPs (2 mM)		72°C	2'
0,2 µl Pfx-Polymerase (10U/µl)	20x	94°C	45''
2,5 µl PCR-Puffer (10 x Pfx-Puffer)		56°C	45''
0,5µl MgSO ₄ (50 mM)		72°C	2'
5,8 µl Aqua. bidest.	1x	72°C	10'

Die Reaktionslösung wurde auf einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt, die rDNA-Fragment mit einer Länge von etwa 1500 bp ausgeschnitten und mit dem Gelextraktionskit (von Invitex) eluiert.

2.4.4.2. Klonierung der rDNA-Fragmente in *E. coli*

Die eluierten Fragmente wurden in *E. coli* kloniert. Dazu wurde die eluierte DNA mit 1 Volumen Isopropanol und 0,1 Volumen Natriumacetat gefällt, anschließend mit 70% Ethanol gewaschen und in 7 µl Aqua bidest. gelöst. Nach der Zugabe von 1 µl dATP (2mM), 1 µl Williamspuffer (10x), 1 µl Taq-Polymerase (5 U/µl) wurde dieses bei 70°C für 15 min inkubiert. Dabei wurden die Enden der Fragmente mittels der A-tailing-Methode verlängert, um eine Ligation in den pGEMT-Klonierungsvektor zu ermöglichen.

Die Ligation wurde mit dem pGEM-T Easy Kit von Promega durchgeführt. Zu 1,5 µl der DNA-Lösung wurde 2,5 µl Rapid Ligationspuffer (2x), 0,5 µl pGEM-T Easy Vektor (50 ng) und 0,5 µl T4 DNA Ligase (3 U/µl) zugegeben. Die Lösung wurde vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren gemischt und anschließend für 16 h bei 4°C inkubiert. 1 µl dieser Lösung wurde für die Transformation in *E. coli*-Zellen verwendet. Dazu wurden 40 µl von hochkompetenten *E. coli*-Zellen des Stammes 'JM109' mit den ligierten Transformationsvektor vorsichtig gemischt, in die Elektropulserkammer gegeben und ein Elektroimpuls von 2,5 kV mit dem *E. coli*-Pulser (von BioRad) gegeben. Nach Zugabe von 1 ml SOC-Nährlösung folgte eine 15' Erholungsphase bei 37°C. 100 µl der Lösung wurden auf IPTG/X-Gal-Ampicillin Medium ausplattiert und für 12 h bei 37 °C inkubiert. Nicht transformierte *E. coli*-Klone wuchsen aufgrund von fehlender Ampicillin-Resistenz nicht auf dem Selektionsmedium, während *E. coli*-Zellen mit Vektor diese Resistenz aufwiesen. Außerdem zeigten nicht rekombinante Klone eine Blaufärbung, während rekombinante Kolonien eine weißliche Farbe hatten. Nach der Selektion der *E. coli*-Klone wurde die den rDNA-Abschnitt enthaltenen Plasmide aufgereinigt (siehe oben), um diese in die Sequenzierungsreaktion einzusetzen.

2.4.4.3. Sequenzierung

Die Sequenzreaktion wurde wie oben angegeben durchgeführt, allerdings mit 0,08 pM Primer Oli14-N700 (Fluoreszenzfarbstoff), 0,08 pM Primer ITS 4-N800, 12% DMSO, 50 Volumenprozent des A, C, G, bzw. T-Mixes und 100 ng Plasmid-DNA bzw. PCR-Fragment bei der direkten Sequenzierung.

PCR-Reaktionsansatz	PCR-Reaktion		
1 µl DNA-Lösung (100 ng DNA)	1x	95°C	2'
0,15 µl Primer Oli14-N700 (2 µM)	30x	95°C	15''
0,15 µl Primer ITS4-N800 (2 µM)		50°C	30''
0,46 µl DMSO		65°C	90''
0,24 µl Aqua. bidest.	1x	72°C	10'
2 µl A, C, G bzw. T-Mix			

Nach Zugabe von 4 µl Ladepuffer wurden die Proben auf einem Sequenziergel in der Licor-Sequenzieranlage aufgetrennt. Anschließend wurden die Sequenzen mit der Sequenziersoftware Image Analysis (Version 4.1h) ausgelesen. Bei den klonierten rDNA-Abschnitten konnte zusätzlich noch der flankierende Bereich ermittelt werden. Dazu wurden die Primer M13 uni-N700 und M13 rev-N800 anstelle von Oli14 und ITS4, wie oben angegeben, eingesetzt.

2.4.4.4. Analyse der rDNA-Sequenzen

Nachdem die Sequenzen des rDNA-Abschnittes der verschiedenen Pilzstämmen ermittelt worden sind, konnten diese miteinander verglichen werden.

Die Sequenzen wurden mit der Software Clustalx (Version 1.8) und Bioedit (Version 5.0.9) einem Alignment unterzogen, zusammengefügt und mit Hilfe der scf-File auswertenden Software Trev (Version 1.6) aus dem Staden Softwarepaket manuell korrigiert. Im nächsten Schritt wurden mit dem Software Programm Mega2 (Version 2.1) die variablen Positionen, die nach dem Parsimony-Prinzip informativen Positionen, sowie die Anzahl der eingefügten Gaps ermittelt. Zur Quantifizierung der Variation innerhalb der Gattung *Diplocarpon* wurde das Alignment zu einer Distanzmatrix verrechnet. Dazu wurde das Programm dnadist, aus dem Software Paket Phylip 3.5c, unter Verwendung des JUKES und CANTOR Modells (1969) eingesetzt. Die phylogenetische Analyse wurde nach dem Parsimony-Prinzip erstellt, wobei das Software Paket Phylip 3.5c verwendet wurde. Im ersten Schritt wurde ein sogenanntes „Bootstrapping“ mit 100 Wiederholungen mittels seqboot durchgeführt. Anschließend wurden hieraus 100 Stammbäume nach dem Parsimony-Prinzip mit dnapars berechnet. Aus diesen Stammbäumen wurde mittels consensus ein Konsensbaum mit Bootstrappingwerten berechnet. Die Sequenzen der Arten, die nicht zur Gattung *Diplocarpon* gehören, wurden aus der Datenbank von NCBI (National Center for Biotechnology Information) bzw. TreeBASE (Universität Buffalo) entnommen und in die Analysen eingefügt.

3. Ergebnisse

3.1. Morphologische und histologische Charakterisierung des Pathosystem *Diplocarpon rosae* - *Rosa* spp.

Für die Charakterisierung des Pathosystem wurden 81 Rosen-Genotypen (Tab. 2.1), bestehend aus 66 verschiedenen Wildarten sowie 4 Hybriden, mit *D. rosae* inokuliert und die daraus resultierenden Interaktionen analysiert.

Ein Großteil der Versuche wurde mit dem monoklonalen Sternrusstaustamm 'Dort E4' (DEBENER et al. 1998), mit der fortlaufenden Lagerbezeichnung *D. rosae* '100', durchgeführt. Durch die Verwendung eines definierten Inokulums konnte eine hohe Reproduzierbarkeit gewährleistet werden, was besonders bei dem Vergleich der mikroskopischen Strukturen des Erregers in Abhängigkeit vom Wirtsgenotyp notwendig ist. In dem Kapitel 3.1.2. wurden noch weitere Inokula verwendet, um das Resistenzverhalten der Rosen gegenüber einem breiten Spektrum an Erregern zu evaluieren. Dazu wurden Konidienmischungen sowie auch monoklonale Stämme, die aus Freilandproben aufgereinigt wurden, eingesetzt.

3.1.1. Neue Einsporkulturen von *D. rosae*

In Tabelle 3.1. sind zusätzlich zu 'Dort E4' die neuen *D. rosae*-Einsporisolate aufgeführt. Sie wurden aus Freilandproben isoliert, aufgereinigt und anschließend bei – 80 °C als axenisches Material kryokonserviert.

Nur ein Teil dieser neuen *D. rosae*-Stämme ließen sich wieder auf Blattmaterial zurückführen. Von den 30 Stämmen, die in Petrischalenkultur aufgereinigt worden sind, ließen sich 19 nicht wieder auf Blätter übertragen. Nur mit 16 dieser Stämme ließ sich *R. hybrida* 'Pariser Charme' erfolgreich inokulieren (Tab. 3.1).

Tab.3.1: Neue *D. rosae*-Einsporkulturen: Infektion von Blattmaterial der Rose 'Pariser Charme' mit axenischen Einsporkulturen von *D. rosae*.

Pilzstamm	Herkunft	erfolgreiche Infektion
'100'	Dortmund ('Dort E4')	-
'101'	Ahrensburg	-
'102'	Ahrensburg	-
'103'	Ahrensburg	+
'104'	Ahrensburg	-
'105'	Inowroclaw/ Polen	+
'108'	Gütersloh	+
'109'	Ahrensburg	-
'110'	Požmań/Polen	+
'111'	Ahrensburg	+
'113'	Portugal	+
'114'	Alsmeer/ Holland	+
'116'	Lódź/ Polen	+
'117'	Wetteren/ Belgien	-
'118'	Cottbus	-
'119'	Norditalien	+
'120'	Antonio Prado/ Brasilien	+
'121'	Poona/Indien	+
'123'	Zimbabwe	+
'124'	Poona/ Indien	+
'125'	Griechenland	-
'127'	Berlin	+
'128'	Ungarn	+
'129'	Istanbul/ Türkei	-
'130'	Pistonina/ Italien	-
'134'	Baden-Baden	-
'135'	Belgien	-
'139'	Shropshire/ England	-
'140'	Shropshire/ England	-
'141'	Frankreich	-
'142'	Frankreich	-
'143'	Ciba/ Japan	-
'147'	Istanbul/ Türkei	-
'151'	Narre Warren North/ Australien	-
'152'	Narre Warren North/ Australien	+

3.1.2. Besiedlungsstärke von *D. rosae* auf verschiedenen Rosengenotypen

In den Inokulationsversuchen wurde eine unterschiedlich starke Ausprägung der Besiedlung mit *D. rosae* in Abhängigkeit vom Wirt festgestellt (siehe Tabelle 3.2). Um die gesamte Variationsbreite der Besiedlungsstärke aufzunehmen, wurde ein 5 stufiges Boniturschema entwickelt, wobei der Wert 0 für keine Besiedlung und der Wert 4 für starke Besiedlung mit *D. rosae* steht. Zur Standardisierung wurden die einzelnen Boniturstufen fotografisch dokumentiert und dienten als Referenz für die Charakterisierung der Besiedlungsstärke (siehe Abbildung 3.1).

0: es findet keine Besiedlung des Blattes mit den inokulierten Konidien statt. Entweder keimen die Konidien nicht aus, oder die Keimschläuche durchdringen die Kutikula nicht (siehe Abbildung 3.1a).

1: die inokulierten Konidien keimen aus, durchdringen die Kutikula und penetrieren einzelne Epidermiszellen. Eine weitere Kolonisierung sowie Bildung von Azervuli bleiben aus (siehe Abbildung 3.1b).

2: *D. rosae* kann sich im Blatt etablieren und langsam ausbreiten (siehe Abbildung 3.1c).

3: der Erreger breitet sich im Blatt aus und bildet teilweise Azervuli als reproduktive Strukturen aus (siehe Abbildung 3.1d).

4: kräftige Entwicklung von Kolonien, die auch massiv Azervuli ausbilden (siehe Abbildung 3.1e).

Für die Differenzierung der Besiedlungsstärke in Abhängigkeit vom Inokulum wurden zwei Kategorien unterteilt. In der ersten Kategorie wurden die Inokulationen mit *Diplocarpon rosae* 'Dort E4' aufgenommen. Durch die Verwendung eines monoklonalen Stammes konnte eine hohe Reproduzierbarkeit gewährleistet werden. In der zweiten Kategorie wurden die übrigen Inokulationsexperimente ausgewertet, wobei verschiedenste *Diplocarpon rosae* Herkünfte verwendet wurden. Die Auswertung erfolgte zum Großteil nach makroskopischen Merkmalen, wobei stichpunktartige und in Zweifelsfällen mikroskopische Untersuchungen wie beim Isolat 'Dort E4' durchgeführt wurden.

Inokuliert wurde mit Einsporisolaten, definierten Konidiengemischen und Freilandgemischen. Einsporisolate wurden von dem Stamm '101', '124' sowie '121' (Tab. 3.1) eingesetzt. Um ein breites Spektrum an Erregertypen auszutesten, wurden 3 unterschiedliche Inokulationsgemische angesetzt. Dazu wurden vorher eingestellte Konidien suspensionen verschiedener Einsporisolate zu gleichen Teilen gemischt. Gemisch A bestand aus Isolat '120', '121' und '123', Gemisch B aus '105' und '116' und Gemisch C aus '108', '113', '128', '152'. Außerdem wurde mit Suspensionen aus

Freilandsammlungen von den hauseigenen Versuchsfeldern und von den Versuchsfeldern der Firmen Noack Rosen sowie Kordes' Söhne inokuliert.

Tabelle 3.2: Besiedlungsstärke von *Diplocarpon rosae* auf verschiedenen Rosengenotypen.

Rosenart	Genotyp-bezeichnung	Besiedlungs-stärke von <i>D. rosae</i> ‚Dort E4‘ ^a	Besiedlungs-stärke von anderen <i>D. rosae</i> -Inokula ^b	Anzahl anderer getesteter Inokula	Anzahl der Inokulationen mit <i>D. rosae</i> ‚Dort E4‘	Gesamtzahl der Inokulationen mit <i>D. rosae</i>
<i>Rosa acicularis</i>	93-01-01	1	2	3	3	10
<i>R. agrestis</i>	93-02-01	0	2	7	1	9
<i>R. anemoniflora</i>	00-58-02	3	2	2	1	5
<i>R. arkansana</i>	00-54-03	2	3	3	3	6
<i>R. arvensis</i>	93-03-01	1	1	3	4	11
<i>R. banksiae</i>	00-58-01	2	2	2	1	4
<i>R. bella</i>	00-31-01	0	0	7	1	9
<i>R. bella</i>	00-57-04	1	1	2	1	4
<i>R. blanda</i>	93-04-01	2	3	8	3	11
<i>R. britzensis</i>	93-05-01	3	2	1	1	3
<i>R. californica</i> var. <i>plena</i>	00-32-01	1	1	5	1	7
<i>R. californica</i> var. <i>plena</i>	00-33-01	1	-	-	1	1
<i>R. canina</i>	93-06-01	1	-	-	3	3
<i>R. canina</i>	93-06-04	2	0	1	1	3
<i>R. canina</i> var. <i>nervulosa</i>	00-33-02	0	1	2	1	4
<i>R. canina</i> 'Inermis'	93-06-09	3	-	-	1	1
<i>R. carolina</i>	93-07-01	2	2	1	3	4
<i>R. caudata</i>	94-103-02	1	1	6	4	12
<i>R. chinensis</i>	00-57-03	3	3	2	1	4
<i>R. corymbifera</i> 'Laxa'	93-10-01	2	2	5	4	9
<i>R. damascena</i>	93-58-01	2	2	1	2	3
<i>R. foetida</i>	93-12-01	3	3	3	3	6
<i>R. foetida</i> var. <i>persiana</i>	93-14-02	3	3	1	1	2
<i>R. foliolosa</i>	93-15-01	2	3	6	3	10
<i>R. gallica</i>	93-16-01	1	1	4	3	8
<i>R. helenae</i>	93-18-01	2	2	1	2	4
<i>R. 'Hi 364'</i>	00-35-01	0	0	2	1	3
<i>R. hirtissima</i>	00-56-05	0	2	4	1	5
<i>R. hugonis</i>	93-19-01	3	3	3	3	7
<i>R. jundzillii</i>	93-22-01	2	0	2	3	5
<i>R. kordesii</i>	93-20-01	2	-	-	1	1
<i>R. longicuspis</i>	00-56-04	3	3	2	3	6
<i>R. lyellii</i>	00-37-01	0	0	5	1	7
<i>R. macrophylla</i>	93-21-01	1	1	4	1	5
<i>R. majalis</i>	93-09-01	0	0	5	2	7
<i>R. majalis</i>	93-09-02	0	0	4	3	7
<i>R. manca</i>	00-56-03	3	3	2	1	3
<i>R. mollis</i>	93-24-01	3	2	1	3	4
<i>R. moschata</i>	00-56-02	2	2	2	1	4
<i>R. moyesii</i>	93-25-04	0	0	6	3	9
<i>R. multibracteata</i>	93-26-01	0	1	6	3	9
<i>R. multiflora</i>	93-27-02	1	1	8	4	16

<i>R. multiflora</i> var. <i>watsoniana</i>	00-38-01	3	2	2	1	4
<i>R. multiflora</i> x <i>wichuraiana</i>	00-38-02	0	0	6	1	7
<i>R. nanothamnus</i>	00-56-01	1	1	1	1	2
<i>R. nitida</i>	93-29-01	1	1	2	3	5
<i>R. nutkana</i>	93-30-01	1	1	7	4	13
<i>R. obtusifolia</i>	93-31-01	2	1	1	3	5
<i>R. omeiensis</i>	93-39-01	0	0	6	3	9
<i>R. hybrida</i> 'Patrizia'	00-39-01	2	2	2	1	4
<i>R. pendulina</i>	93-32-02	2	2	1	3	5
<i>R. pendulina</i> X <i>spinosissima</i>	00-40-01	0	0	5	1	7
<i>R. pendulina</i> X <i>spinosissima</i>	00-40-03	1	1	2	1	4
<i>R. pisocarpa</i>	93-33-01	3	3	1	3	4
<i>R. pomifera</i> var. <i>engadinensis</i>	00-55-07	3	3	1	1	2
<i>R. pomifera</i> var. <i>typica</i>	00-55-06	1	-	-	1	1
<i>R. prattii</i>	00-55-05	2	2	2	1	3
<i>R. primula</i>	00-55-04	2	2	2	1	3
<i>R. roxburghii</i>	93-35-02	0	0	8	3	13
<i>R. rubiginosa</i>	93-11-01	2	-	-	2	2
<i>R. rubiginosa</i>	93-11-06	1	1	7	4	13
<i>R. rubrifolia</i>	93-17-06	3	-	-	1	1
<i>R. rubus</i>	00-55-03	2	2	5	1	6
<i>R. rugosa</i> var. <i>regeliana</i>	93-36-04	0	0	6	1	8
<i>R. sancta</i>	00-57-05	3	2	2	1	3
<i>R. serafinii</i>	00-55-01	4	2	1	1	2
<i>R. setigera</i> var. <i>serena</i>	00-47-02	0	1	4	1	5
<i>R. spinosissima</i>	93-42-01	3	3	1	1	3
<i>R. suffulta</i>	00-54-04	0	2	4	1	5
<i>R. sweginzowii</i> <i>macrocarpa</i>	93-45-01	0	1	7	4	12
<i>R. texarkana</i>	00-53-07	1	1	5	1	6
<i>R. tomentosa</i>	93-46-01	3	3	1	3	5
<i>R. villosa</i>	93-24-03	3	2	2	3	6
<i>R. virginiana</i>	00-42-02	0	0	7	1	9
<i>R. virginiana</i>	93-47-02	2	3	1	3	5
<i>R. vosagiaca</i>	93-98-01	3	0	1	1	2
<i>R. webbiana</i>	00-53-06	3	1	2	1	3
<i>R. wichuraiana</i>	93-99-01	1	1	9	4	15
<i>R. woodsii</i>	93-49-01	0	0	6	3	9
<i>R. xanthina</i> var. <i>spontanea</i>	00-53-05	4	3	2	1	3
<i>R. zalana</i>	00-53-04	0	2	5	1	6

Besiedlungsstärke von *Diplocarpon rosae* in Abhängigkeit vom Wirt.

Stufen 0 (keine Besiedlung) bis 4 (starke Besiedlung)

a: Besiedlungsstärke von *D. rosae* 'Dort E4': Besiedlungsstärke von *D. rosae* 'Dort E4' in Abhängigkeit vom Wirt;

b: Besiedlungsstärke von anderen *D. rosae*-Inokulaten: Besiedlungsstärke von *D. rosae* in Abhängigkeit vom Wirt; die Untersuchungen wurden nur zum Teil mikroskopisch durchgeführt

Die 81 mit *D. rosae* 'Dort E4' inokulierten Genotypen wurden wie in Tabelle 3.3. angegeben eingestuft. 39 Genotypen werden der Kategorien 0 und 1 zugeordnet und sind resistent gegen den Befall von *D. rosae* 'Dort E4'

Die 74 mit anderen Isolaten bzw. Gemischen inokulierten Genotypen wurden wie in Tabelle 3.4. angegeben eingestuft. Dabei sind 36 resistent gegen die getesteten Isolate.

In Tabelle 3.5. sind die Rosengentypen sortiert nach der Besiedlungsstärke. Es wurden die Boniturnwerte aus Tabelle 3.3. und 3.4 verglichen und jeweils der höhere Wert für die einzelnen Genotypen verwendet.

Tabelle 3.3: Anzahl der Rosen-Genotypen sortiert nach der Besiedlungsstärke von *D. rosae* 'Dort E4'

Boniturstufe	Anzahl
0	21
1	18
2	20
3	20
4	2

Tabelle 3.4: Anzahl der Rosen-Genotypen sortiert nach der Besiedlungsstärke von *D. rosae* evaluiert mit verschiedenen *D. rosae*-Stämmen und Inokulationsgemischen

Boniturstufe	Anzahl
0	16
1	20
2	23
3	15
4	0

Tabelle 3.5: Anzahl der Rosengentypen sortiert nach der Besiedlungsstärke von *D. rosae*

Boniturstufe	alle Isolate
0	13
1	21
2	21
3	24
4	2

3.1.3. Morphologie und Zellformen des Erregers

In den morphologischen und histologischen Untersuchungen der individuellen Wirtspflanzen-Erreger-Interaktion konnten 8 verschiedene Zellformen von *Diplocarpon rosae* unterschieden werden. Grundsätzlich konnten diese in somatische und reproduktive Strukturen unterteilt werden.

1) Somatische Strukturen:

1.1) Keimschlauch (siehe Abbildung 3.1a und b): Die Konidien keimen mit einem Keimschlauch aus, der die Kutikula durchdringt und anschließend ein Haustorium in eine Epidermiszelle senkt. Meist wird nur ein Keimschlauch pro Konidie gebildet.

1.2) Langhyphen (siehe Abbildung 3.1d und 3.2a): Diese Hyphen wachsen subkutikulär zwischen der Kutikula und den adaxialen Epidermiszellen. Typisch für diese Hyphenform sind die rhizomorphen Stränge aus 2-5 parallel verlaufenden Hyphen.

1.3) Kurzhyphen (siehe Abbildung 3.2b): Dieser Typ dringt in den Interzellularraum zwischen den adaxialen Epidermiszellen sowie auch dem Pallisadenparenchym ein. Terminal enden diese mit einem Haustorium.

1.4) Haustorien (siehe Abbildung 3.2b und c): Die Haustorien sind die einzigen intrazellulär wachsenden Hyphen. Die Haustorien haben eine typische, elliptische Form, wobei das apikale Ende meist verlängert und zugespitzt ist.

2) Reproduktive Strukturen:

2.1) Rundhyphen: Die Ausbildung eines Azervulus beginnt mit den Rundhyphen. Diese entstehen subkutikulär und sind kreisförmig angeordnet.

2.2) Pseudoplektenchymatische Hyphen (siehe Abbildung 3.2d): Diese bilden eine Schicht zwischen den Epidermiszellen und der Kutikula. Die Hyphen wachsen zentrifugal auseinander, so dass ein kreisförmiges Lager entsteht.

2.3) Konidiogene Hyphen (siehe Abbildung 3.2e): Auf den pseudoplektenchymatischen Lager bilden sich einzellige konidiogene Zellen aus.

2.4) Konidien (siehe Abbildung 3.2e und f): Die zweizelligen Konidien werden subkutikulär gebildet. Im weiter fortgeschrittenen Stadien reißt die Kutikula auf und entlässt die Verbreitungseinheiten.

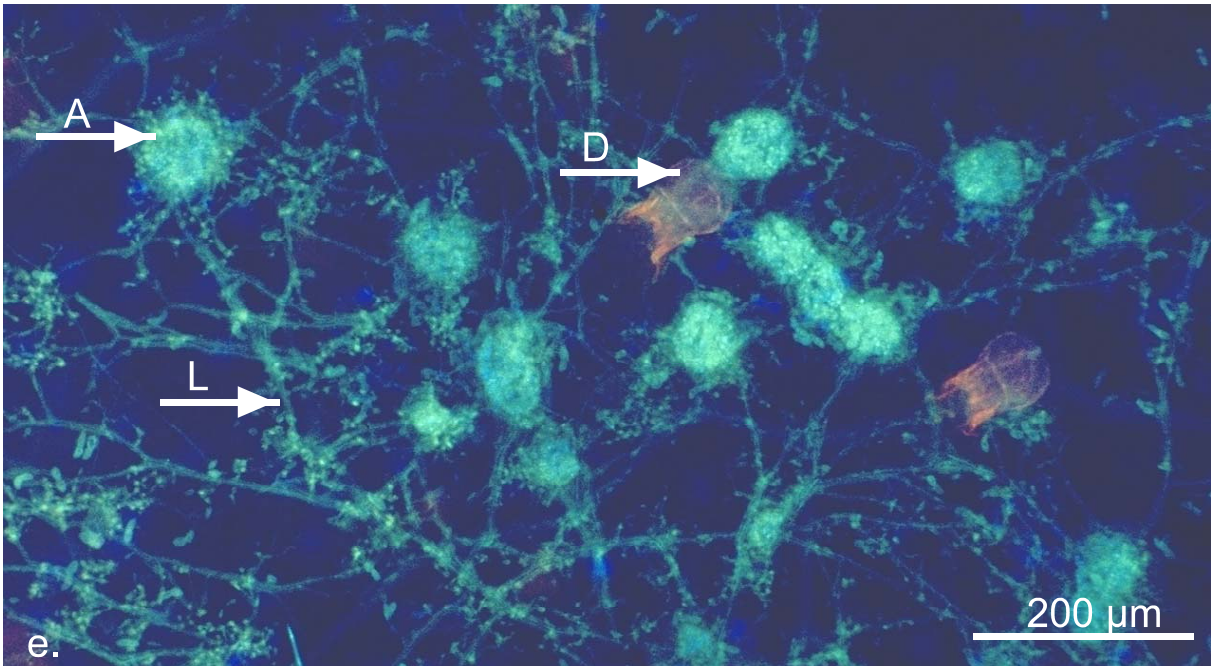
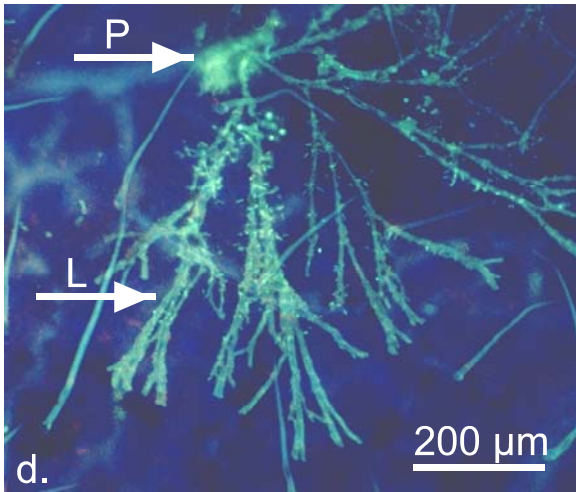
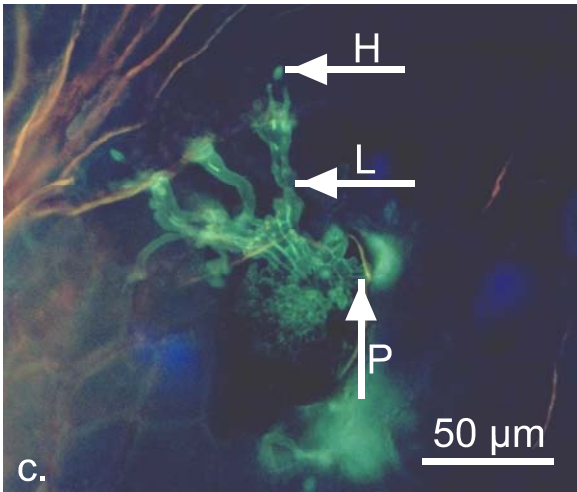
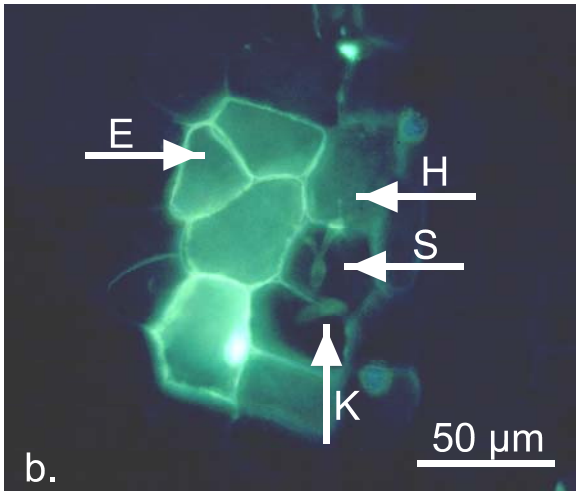
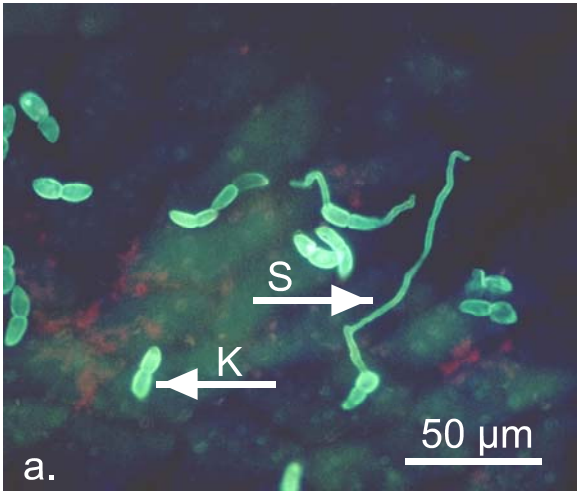


Abbildung 3.1: Interaktion von *Diplocarpon rosae* 'Dort E4' mit verschiedenen Rosengenotypen 7 Tage nach der Inokulation; Aufsicht auf Rosenblätter angefärbt mit Anilinblau und betrachtet im Epifluoreszenzmikroskop

- a. Besiedlungsstärke 0: gekeimte Sternrusstau-Konidien auf *Rosa multibracteata*; Die Keimschläuche durchdringen die Kutikula des Rosenblattes nicht. Es kommt zu keiner Ausbildung von subkutikulären Hyphen oder Haustorien
 - b. Besiedlungsstärke 1: gekeimte Sternrusstau-Konidie auf *R. caudata*. Der Keimschlauch penetriert die Kutikula und bildet terminal 2 knopfförmige Haustorien in den Epidermiszellen aus.
 - c. Besiedlungsstärke 2: Besiedlung von *R. obtusifolia*. Der Sternrusstau hat eine kleine Kolonie im Rosenblatt gebildet. Am Penetrationsort haben sich reproduktive Strukturen in Form von pseudoplektenchymatische Hyphen ausdifferenziert.
 - d. Besiedlungsstärke 3: Besiedlung von *R. foetida var. persiana*. Der Sternrusstau hat sich im Blatt etabliert, breitet sich rasch aus und zeigt Ansätze von reproduktiven Strukturen.
 - e. Besiedlungsstärke 4: Besiedlung und reproduktive Strukturen vom Sternrusstau auf *R. serafinii*. Der Sternrusstau hat sich im Blatt etabliert, breitet sich rasch aus und hat Azervuli gebildet.
- Konidie: K, Keimschlauch: S, Haustorium: H, Langhyphe: L, pseudoplektenchymatische Hyphen: P, Epidermiszelle der Rose: E, Drüsenhaar der Rose: D; Azervulus: A

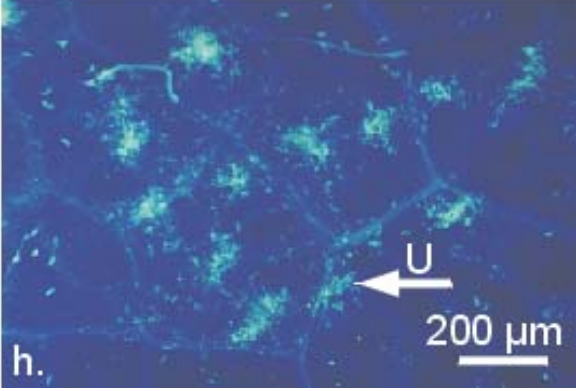
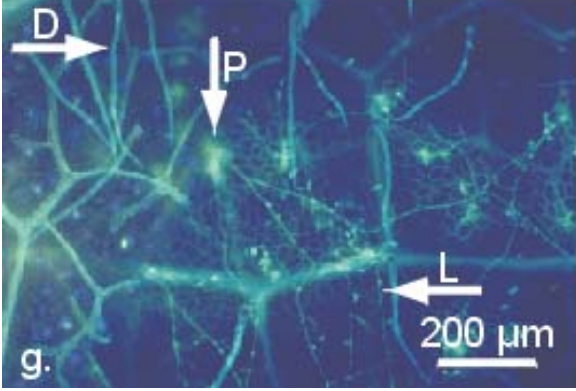
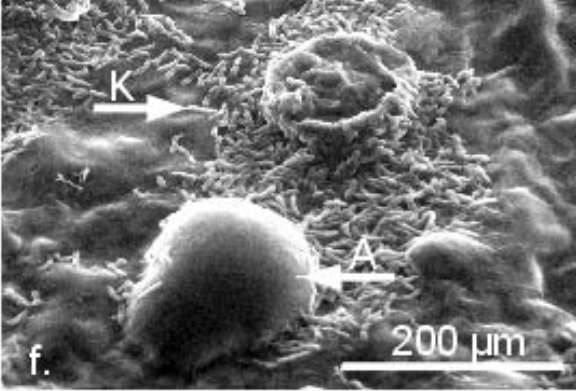
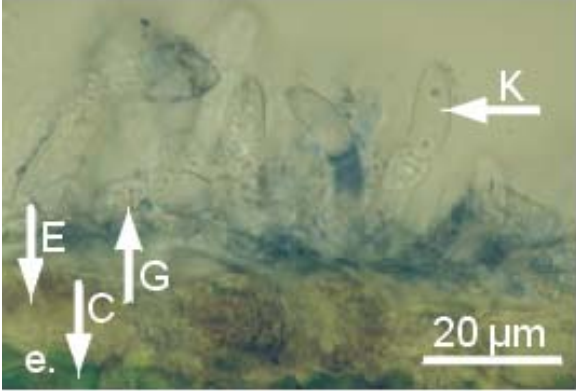
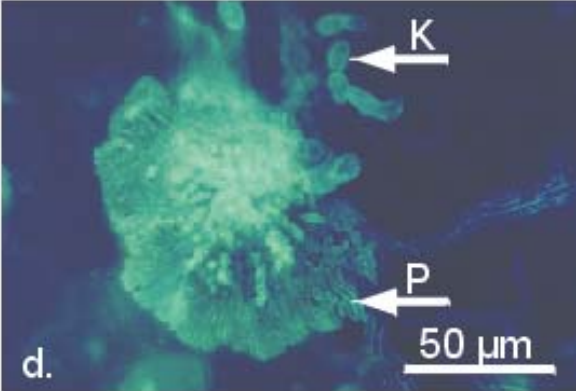
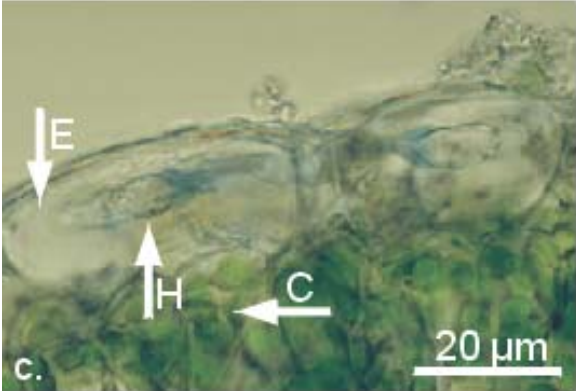
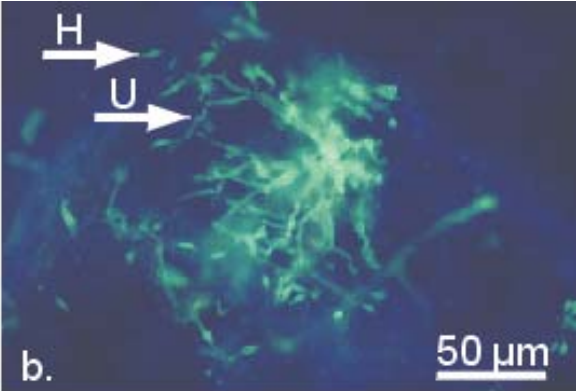
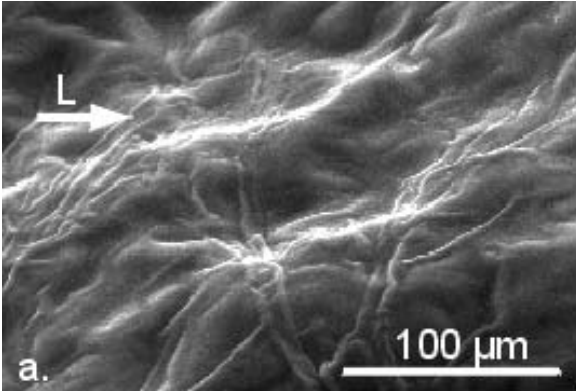


Abbildung 3.2: Interaktion von *Diplocarpon rosae* 'Dort E4' mit verschiedenen Rosengenotypen

a. Aufsicht auf die adaxiale Seite eines Laubblattes 14 Tagen nach Inokulation. Die Hyphenstränge verlaufen subkutikulär und sind als Aufwölbung der Kutikula zu erkennen. Aufnahme mit ESEM

b. *R. foliolosa* 7 Tage nach Inokulation. Auf diesen Wirt wächst *D. rosae* als Typ 2.1. Epifluoreszenzmikroskopie. Angefärbt mit Anilinblau.

c. *R. hybrida* 'Pariser Charme' 7 Tagen nach Inokulation. Die Haustorien wachsen intrazellulär in den Epidermiszellen. Blattquerschnitt angefärbt mit Baumwollblau. Hellfeldmikroskopie.

d. *R. arkansana* 7 Tage nach Inokulation. Vor der Konidiogenese wird ein pseudoplektenchymatisches Scheingewebe zwischen Kutikula und Epidermiszellen angelegt. Epifluoreszenzmikroskopie. Angefärbt mit Anilinblau.

e. *R. hybrida* 'Pariser Charme' 7 Tage nach Inokulation. Querschnitt durch einen Azervulus. Auf dem Scheingewebe differenzieren sich Konidien aus. Die Epidermiszellen sind abgestorben und kollabiert. Die Kutikula ist bereits aufgerissen. Blattquerschnitt angefärbt mit Baumwollblau.

f. Aufsicht auf die adaxiale Seite eines Laubblattes 14 Tage nach Inokulation. Zwei Azervuli sind auf der Blattoberfläche zu erkennen. Bei einem Azervulus ist die Kutikula bereits aufgerissen, so dass die Konidien freigesetzt wurden. Beim gekennzeichneten Azervulus wurde die Kutikula durch die Konidienmasse hochgewölbt. Aufnahme mit ESEM.

g. *R. rubus* 7 Tage nach Inokulation. Auf dieser Rose bildet *D. rosae* den Typ 1.2. aus. Epifluoreszenzmikroskopie. Angefärbt mit Anilinblau.

h. *R. foliolosa* 7 Tage nach Inokulation. Auf dieser Rose hat *D. rosae* zahlreiche Kolonie nach den Typ 2.1. ausgebildet. Angefärbt mit Anilinblau. Epifluoreszenzmikroskopie.

Konidie: K, Haustorium: H, Langhyphe: L, Pseudoplektenchymatische Hyphen: P, Epidermiszelle der Rose: E, Haar der Rose: D; Azervulus: A; Kurzhyphe: U; Pallisadenparechym: C; konidiogene Zelle: G;

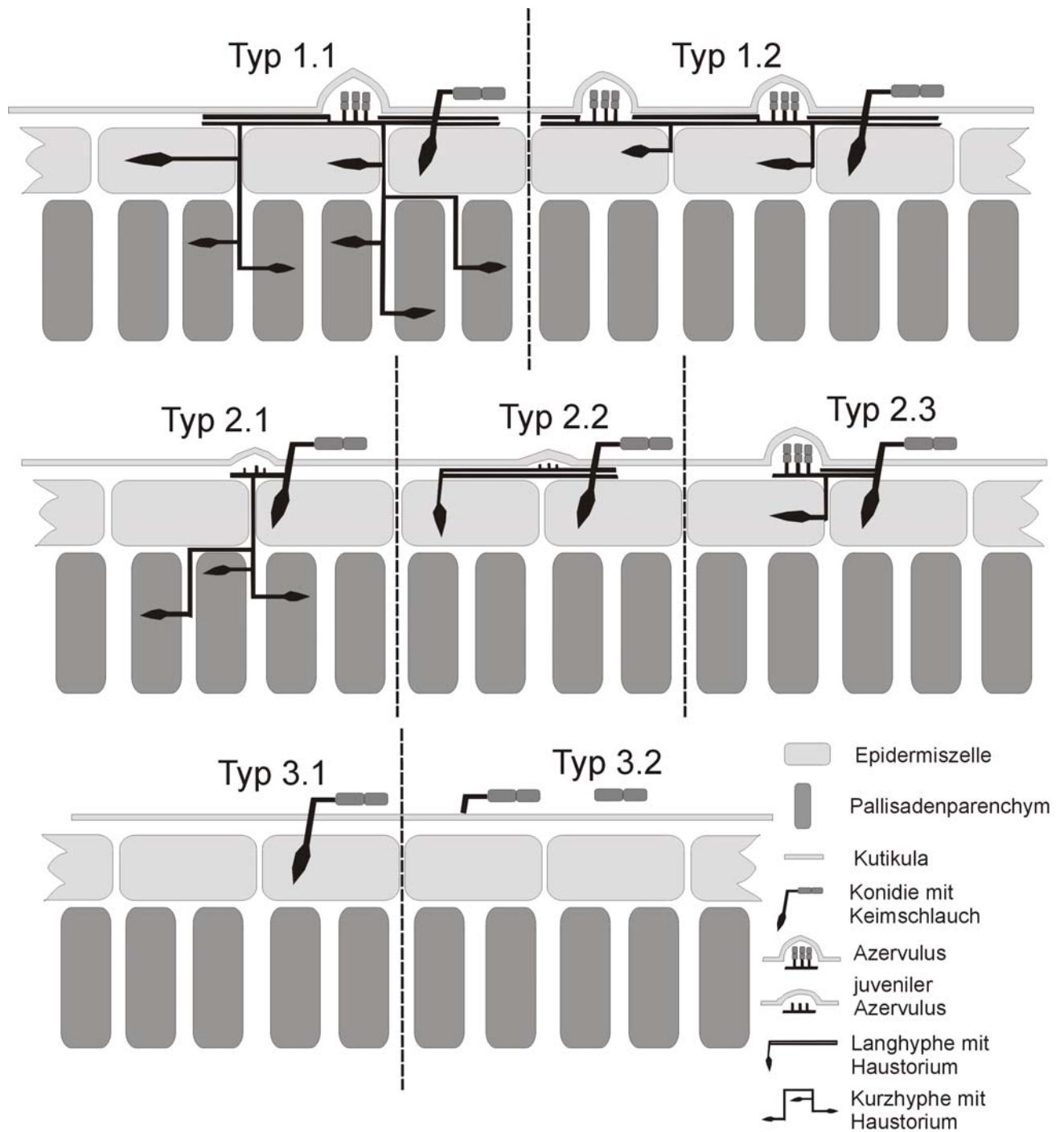


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Interaktionsformen von *Diplocarpon rosae* mit verschiedenen Rosengenotypen

Type 1.1: Normaltyp

Type 1.2: Langhypothen Typ

Type 2.1: Kurzhypothen Typ

Type 2.2: Canina Typ

Type 2.3: Pseudoplektenchymatischer Typ

Type 3.1: sehr schwacher Befall

Type 3.2: ohne Befall

3.1.4. Besiedlungsformen des Erregers in Abhängigkeit vom Wirtsgenotyp

In diesem Abschnitt wurde ausgewertet, welche Zelltypen *D. rosae* ‚Dort E4‘ auf den unterschiedlichen Rosengenotypen ausbildet und wie stark die verschiedenen Zellformen ausgeprägt sind. Es können drei Oberkategorien mit insgesamt sieben Unterkategorien beschrieben werden (siehe Abb. 3.3).

1) stark anfällig

In diese Oberkategorie werden Rosengenotypen eingeordnet, auf denen *D. rosae* die Besiedlungsstärke 3 und 4 (siehe Abschnitt 3.1.2) erreicht und reproduktive Strukturen ausbildet.

Typ 1.1: Normal Typ (siehe Abbildung 3.1e und 3.3 Typ 1.1)

Die Interaktion zwischen *D. rosae* ‚Dort E4‘ und *R. hybrida* ‚Pariser Charme‘ wurde als Referenz verwendet und zum Normaltyp erklärt. Dieser zeichnet sich dadurch aus, dass der Parasit das gesamte Spektrum an Hyphen ausbildet. In dieser Weise besiedelt *D. rosae* ‚Dort E4‘ die untersuchten Rosengenotypen *R. hybrida* ‚Pariser Charme‘ und *R. tomentosa* und *villosa*.

Typ 1.2: Langhyphen Typ (siehe Abbildung 3.1d und 3.2g und 3.3 Typ 1.2)

In dieser Form der Interaktion bildet *D. rosae* zahlreiche parallele und subkutikuläre Hyphenstränge aus. Diese Hyphen sorgen für eine rasche Ausbreitung vom Infektionsort über das restliche Blatt. Diese Besiedlungsform bildet der Parasit auf *Rosa foetida*, *R. hugonis*, *R. rubus* und *R. longicuspis* aus.

2) mäßig anfällig

In diese Kategorie werden Rosen-Genotypen eingeordnet, die zwar von *D. rosae* befallen werden, bei denen jedoch die Besiedlungsstärke des Pilzes im Vergleich zum stark anfälligen Typ reduziert ist. Meist sind juvenile reproduktive Strukturen vorhanden.

Typ 2.1: Kurzhyphen Typ (siehe Abbildung 3.2b und h und 3.3 Typ 2.1)

Der Parasit bildet in dieser Form der Interaktion kaum bis keine Langhyphen aus. Das Myzel besteht im wesentlichen aus Kurzhyphen und Haustorien. Die Ausbreitung im Blatt erfolgt sehr langsam. In fortgeschrittenen Stadien werden auch reproduktive Zellformen am Inokulationsfleck gebildet.

Der Kurzhyphentyp wird in der Interaktion zwischen *D. rosae* ‚Dort E4‘ und *R. blanda* und auch *R. foliolosa* ausgebildet.

Typ 2.2: Canina Typ (siehe Abbildung 3.1c und 3.3 Typ 2.2)

Beim Canina Typ bildet der Pilz wenige aber kräftige parallele Hyphenstränge aus. Diese sind meist unverzweigt. Kurzhyphen und Haustorien werden nur selten gebildet. Dieser Typ der Interaktion wird mit *Rosa acicularis*, *R. canina*, *R. corymbifera* und *R. rubiginosa* gebildet.

Typ 2.3: Pseudoplektenchymatischer Typ (siehe Abbildung 3.2d und 3.3 Typ 2.3)

In dieser Interaktion bildet *D. rosae* besonders viele Azervuli im Vergleich zum Normaltyp aus. Im mikroskopischen Bild fallen dementsprechend besonders die pseudoplektenchymatischen Hyphen auf. Andere Hyphenformen, wie parallele Hyphenstränge und Kurzhyphen sind vorhanden, werden aber nur im geringen Umfang ausgebildet. Dieser Typ wird in der Interaktion mit *Rosa arkansana*, *R. pendulina* und *R. pisocarpa* gebildet.

3) nicht anfällig

In diese Kategorien fallen Rosengenotypen bei denen keine bis fast keine Besiedlung stattfindet. Die Besiedlungsstärke von *D. rosae* hat den Wert 0 oder 1 und es werden keine reproduktive Strukturen ausgebildet.

Typ 3.1: sehr schwacher Befall (siehe Abbildung 3.1b und 3.3 Typ 3.1)

In diesen Fall findet eine primäre Besiedlung des Wirtes statt, aber der Parasit breitet sich nicht bis fast gar nicht im Blatt aus. Sieben Tage nach der Inokulation hat der Parasit maximal 5 epidermale Rosenzellen besiedelt. Die befallenen Epidermiszellen sind bei Genotypen wie z.B. *R. caudata* auf Grund der starken Kalloseapposition ebenfalls angefärbt. Dieser Typ kommt in der Interaktion mit *Rosa caudata*, *R. gallica*, *R. multiflora*, *R. wichuraiana* und *R. woodsii* vor.

Typ 3.2: ohne Befall (siehe Abbildung 3.1a und 3.3 Typ 3.2)

Der Parasit ist nicht in der Lage eine primäre Besiedlung durchzuführen. Der Parasit überschreitet nicht das Keimstadium und bildet kein Haustorium aus. Entweder kommt es zu keiner Auskeimung der Konidien oder die Keimschläuche durchdringen die Kutikula nicht. Dieses ist in der Interaktion von *D. rosae* 'Dort E4' mit *Rosa majalis*, *R. moyesii*, *R. multibracteata*, *R. nitida*, *R. omeiensis* und *R. svegezowii macrocarpa* zu beobachten.

3.2. Molekularbiologische Charakterisierung des Pathogens

Diplocarpon rosae

Die Interaktion zwischen Rosen und Sternrusstau wird sowohl von den Rosen als auch vom Sternrusstaugenotyp beeinflusst. Auf Grund von fehlenden morphologischen Merkmalen zur intraspezifischen Unterteilung des Sternrusstaus wurde nach molekularbiologischen Differenzierungsmerkmalen gesucht. Dieses erfolgte mittels Mikrosatellitenmarkern und AFLP und rDNA-Analyse. Damit konnte eine Unterteilung des Taxon *Diplocarpon rosae* vorgenommen werden und Einblicke in die Populationsstruktur des Erregers gewonnen werden.

3.2.1. Mikrosatellitenmarker für *D. rosae*

Untersuchungen zur Populationsstruktur von *D. rosae* wurden mit Hilfe von Mikrosatellitenmarkern, auch *ssr*-Marker genannt, durchgeführt. Für den Sternrusstau waren noch keine Mikrosatellitenmarker vorhanden, so dass vor den populationsgenetischen Untersuchungen die Etablierung von Mikrosatellitenmarkern stand. Um die Primer zu entwickeln, wurde erstmalig eine DNA-Bank vom *D. rosae*-Genom angelegt.

3.2.2. DNA-Bank

Um 1 µg genomische DNA vom Sternrusstau zu erhalten, wurden 6 Kulturen mit je 150 ml MOM-Nährlösung mit myzelbewachsenen Agarblöckchen beimpft und für 4 Wochen bei 22 °C inkubiert. Nach dem Verdau mit Eco RI wurden 100 µg DNA mit einer Basenpaarlänge von 0,5 – 1,5 kb gewonnen.

Die DNA wurde mittels Isopropanol-Fällung auf 5 µl aufkonzentriert, wovon 3 µl in der Ligationsreaktion eingesetzt wurden. Damit wurde eine primäre Phagenbank von ca. 100.000 Klonen erzeugt.

3.2.3. Amplifikation und Screening der Bank

In der ersten Hybridisierungsrunde wurden 150.000 Klone aus der sekundären Phagenbank auf das Vorhandensein von Mikrosatelliten getestet. 155 dieser Klone zeigten positive Signale auf den Autoradiogrammen und konnten vereinzelt werden. Nach der Umwandlung der selektierten Phagenkolonien in phagmidhaltige *E. coli*-Klone und der

anschließenden Hybridisierung konnten die positiven Signale bei 88 der 155 Klonen bestätigt werden.

Tabelle 3.6: Verlauf der Evaluation nach Mikrosatelliten aus der DNA-Bank von *D. rosae* '101'

Anzahl der Klone aus der primären Bank	100.000
Anzahl der untersuchten Klone aus der sekundären Bank	150.000
positive Klone aus der ersten Hybridisierung	155
positive Klone aus der zweite Hybridisierung	88

3.2.4. Sequenzierung der Klone

Anschließend wurden die Inserts der positiv getesteten Klone von beiden Seiten her sequenziert. Die Sequenzen wurden aufgearbeitet, indem die Vektorsequenzen entfernt und die Sequenzen aus den beiden Sequenzläufen zusammengefügt wurden. Sequenzierungs- und Lesefehler wurden entfernt und die ermittelten Sequenzen wurden in eine Datenbank (Lokale Blastdatenbank in Bioedit) überführt.

Parallel dazu wurden die Sequenzen auf das Vorhandensein von Mikrosatelliten sowohl von Hand als auch mittels des Softwareprogramms tandemfind überprüft. Von den 88 Klonen aus der Hybridisierung wurden bei 84 Mikrosatellitenabschnitte gefunden. Die Mikrosatelliten wurden markiert (siehe Abbildung 3.4) und die einzelnen Sequenzen der Klone miteinander verglichen.

Identische Sequenzen sowie Sequenzen mit großer Ähnlichkeit wurden zu Gruppen zusammengefasst. Aus den 84 Sequenzen konnten 26 Gruppen gebildet werden. Die Sequenzen der einzelnen Gruppen wurden mit der lokalen Datenbank verglichen und so konnte den Gruppen zwischen 1-30 Klone zugeordnet werden.

12 Gruppen konnte nur ein Klon, 7 Gruppen konnten 2 Klone, 5 Gruppen konnten 4 Klone, 1 Gruppe konnten 8 Klone und 1 Gruppe konnten 30 Klone zugeordnet werden. Die Basenabfolge innerhalb der einzelnen Gruppen ist identisch, wenn man von der größten Gruppe mit 30 Klonen absieht. Hier beträgt die Ähnlichkeit zwischen den Klonen 75 bis 100%.

In den Klonen der 25 homogenen Gruppen, also ohne die Gruppe mit den 30 Klonen, waren insgesamt 54 unterschiedliche Mikrosatelliten vorhanden. Die Anzahl der Mikrosatelliten pro Klon variierte zwischen eins und sieben (siehe Tabelle 3.7). Die Länge der Mikrosatellitenmotive betrug zwischen 1 und 17 Basen, wobei die meisten im Bereich von 2-10 Basen lagen (siehe Tabelle 3.8). Die Wiederholungsrate der Motive lag zwischen

1,9-26,5 (siehe Tabelle 3.9). Das am häufigsten gefunden Mikrosatellitenmotiv in den Gruppen war ‚AG‘ gefolgt von ‚AAG‘ (siehe Tabelle 3.10).

In der heterogenen Gruppe mit den 30 Mikrosatelliten-Klonen können auf Grund von Sequenzabweichungen 25 Untergruppierungen gebildet werden (Tab. 3.10). In allen Untergruppen kommt der Mikrosatellit mit dem Motive AAT vor. Die Wiederholungsrate des Motives beträgt zwischen 12 und 15,7 –fach, womit der Mikrosatellit eine Länge von 36-47 bp aufweist.

```

TCTGCTCTCAGATGGGAGTKAGACGGACGAAGAAGAAGAAGAAGAAG
AAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGACGTGGAGAAGGAAATCGGCCC
GGGGACGATGAATGATGCATAGAGATAAGCAGGAACATGTGAACATCTTA
  
```

Abbildung 3.4: Sequenzausschnitt vom Klon MDr 5. Der unterstrichene Bereich markiert den Mikrosatelliten. Dieser besteht aus den drei sich wiederholenden Basen ‚AAG‘. Das Mikrosatellitenmotiv wird 17-mal wiederholt.

Tabelle 3.7: Einordnung der unterschiedlichen Klone in Gruppen nach Anzahl der Mikrosatelliten

	gesamt	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	n=6	n=7
Anzahl	25	10	8	2	2	1	1	1

Tabelle 3.8: Anzahl der unterschiedlichen Mikrosatelliten sortiert nach Länge der Mikrosatellitenmotive in Basenpaaren (bp)

	1 bp	2-3 bp	4-5 bp	6-10 bp	11-15 bp	16-20 bp
Anzahl	2	16	11	18	6	1

Tabelle 3.9: Anzahl der Mikrosatelliten mit Wiederholungsrate der Mikrosatellitenmotive

	1-2x	2,1-3x	3,1-5x	5,1-10x	10,1-15x	15,1-20x	>20x
Anzahl	6	10	8	13	3	10	4

Tabelle 3.10: Verteilung von Motiven der Mikrosatelliten. Aufgeführt sind nur die Mono-, Di-, und Trinukleotidmotive.

Motiv	A	AG	GT	AAT	AAG	GAT	CAA	CTG	TGG
Anzahl	2	9	1	1 (25*)	8	2	1	1	1

*Anzahl der unterschiedlicher Mikrosatelliten der heterogenen Gruppe

3.2.5. Herstellung der Primer

Nachdem die Mikrosatellitenbereiche bekannt waren und deren flankierenden Bereiche sequenziert worden sind, konnten Primer für die Markeranalyse hergestellt werden. Die Primerpaare wurden so gelegt, dass sie den Mikrosatelliten flankieren (siehe Abbildung 3.5 und 3.6). Bei optimalen Primerpaaren enthält das entsprechende PCR-Produkt in den späteren Markeranalysen den Mikrosatelliten. Es wurden 33 flankierende Primerpaare entworfen (siehe Tabelle 3.11).

```
GGGAGGGGAGGATAGGGAGGGAGGCTGTGAAAGATGGCTGTGGAGTTGA
GTGGTCATGGAGAGCAGGAGAGCAGGAGAGCAGGAGAGCAGGAGAGCAGG
AGAGCAGGAGAGCAGGAGAGCAGGGGGGGAGCAGATACAGGCGCGGAGAT
CGTACGTYCTGTGACCATGAGAGAGAGAGATGTCAAGGTTTCAGCCGGATG
ATGGGCTCTGGAGATGAAAGGTCGGGGTAGGGAGCG
```

Abbildung 3.5: Sequenzausschnitt vom Klon MDr 9

Der Klon MDr 9 enthält einen 64 bp langen Mikrosatelliten. Das Motiv ist 8 bp lang und wird 8-mal wiederholt. Flankierend um den Mikrosatelliten wurde die optimale Primerbindungsstelle (in Fettschrift) ausgerechnet.

```
GAGCGCGGGCCGAACGAATGGGCCGGCTGGCAGCAAAGCATATGATAGGC
AGTAGATACGAAGTGACAATAGCGGGGCGGGGCATGGCATGGCATGACTG
GGCGCTCTTCCCAGGGGCATGKTTTGTMGTTGTCCTTGTTGTTGTTTGG
GTGTKGATGTHVTTGTNGTGATTGTNGTGGACGCGTCGAAAGTAAACATC
GTACGAAAACATTAAAAACAAAACAGACAAACAAACACATGCAGCCGCAGA
CTCGTCATGGATTTGGCGCCGCGGTCTCCCTCTCACTCTTCCCCTCACTC
TCGGCGCGGATGATGCCAGCCAACGTGGATACAGACCGAGTGGTGACTTG
GCAGTAGATGGATGGGAACCGAAGTACTATTACCAGATGTKGGGATTATT
CCTGAACACGATCTGGGCTGGAAGCACGCAGAGCAGAAGCAGGCCGAGGA
GTTTCGAGGCGGGTGGATCGACCGAGCTTCCCATCCAGCATCCAGGACCC
```

Abbildung 3.6: Sequenzausschnitt vom Klon MDr 33

Der Klon MDr 33 enthält einen 21 bp langen Mikrosatelliten. Das Motiv ist 4 bp lang und wird 5,3-mal wiederholt. Flankierend um den Mikrosatelliten wurde die optimale Primerbindungsstelle (in Fettschrift) ausgerechnet.

Tabelle 3.11: Primerpaare für die Mikrosatellitenanalyse am Sternrusstau. Es wurden 33 MDr-Primer entworfen. Angegeben ist die Bezeichnung der MDr-Primer (**M**ikrosatellitenprimer für *D*iplocarpon *r*osae), die Länge des PCR-Fragmentes für den Referenzstamm *D. rosae* '101', die optimale Annealingtemperatur, sowie die Sequenz des forward sowie des reverse Primer.

	Fragmentlänge	Annealing T [°C]	Primer a 5'-3'	Primer b 5'-3'
MDr1	133	48,3	TAGAAAGGGTCGGAACATAAG	TTCCCTCTTTCCGTAACCTC
MDr2	136	45,4	CAGACATTTGAATACCGT	ACTTCTTTTCTTCTCGATAAC
MDr3	98	48,7	AGCTCCAGAGGCAATAC	TCCGTGTAGCTTGTTAGATAG
MDr4	154	45,2	TGATTCCCTATGCCTTAT	ATTTGAATACCGTTAGAAAAG
MDr5	131	51,3	GGAGTKAGACGGACGAAGA	TGTTACATGTTCTGCTTAT
MDr6	181	58,3	GCTGTGGAGGTTGAGTGGTCA	TCATCTCCAGAGCCCATCATC
MDr7	164	51,8	TCTCCACATGTCTGCGTAGG	CAAAATGTTGGCAAGTGAATG
MDr8	196	59,3	GGAGGGGAGGATAGGGAGGG	CCGGCTGAACCTTGACATCTC
MDr9	116	58,7	GGCTGTGGAGGTTGAGTGGTC	GATCTCCGCGCCTGTATCTG
MDr10	258	47,6	AAGATTGCTGCGGAATAAC	ATCTGAATCTAGCGACCTTTG
MDr11	224	55,4	CCACTGGTGTATTGCGGTTAC	GGCCGATTTCTTCTCCAC
MDr12	347	46,9	CGACATAGGAACAAGAGC	ACAATACTTACTATGCAAGC
MDr13	-	55,4	CACGATAGGAGGCAAGAGGAG	TTACACGCGAAGCACTCAAG
MDr14	-	57,0	ATGGGCTCTGGAGATGAAAGG	ACTGATTGCGGGCATTCTG
MDr15	168	51,9	TCTCCACATGTCTGCGTAGG	GTGTCAAATGTTGGCAAGTG
MDr16	277	56,4	GCGCCACAGATACATCAGG	TTGTTTGCGAACTCACTCATC
MDr17	-	56,1	GGCGATGGCTGAGGTGATG	GGCGTCTCGAGGAAGGCTTAC
MDr18	213	56,6	CTCACTTACGCAACCACCTC	CAGTTCGGTCGTTTCTGTAGC
MDr19	813	57,7	TGAGATGGCGAAGGGGAAGG	TGGAGACTTGACGCGAGATGG
MDr20	130	52,9	GTTCTTCAAAGCGTGTTCTC	AGGCAATCTGAAAGTAGCAAT
MDr21	285	52,7	TGGGATAGCGGTCAAGGTA	AGAAAGGCGAACGAAAGTTAG
MDr22	213	56,4	GCAAGGGTGTGGGATTCTAC	CAAGTCACCACGCCAAGTCTC
MDr23	187	57,3	GATTCGACCCGTTCAATTC	GGATGCGAAGGAGGAAAGGAT
MDr24	429	54,9	GAGAGTAGCGACACCCAAAT	GTGGTATGATTCCGGACAGTCT
MDr25	368	58,7	GGATTGACCCGTTCAATTC	ACTGCTTGGCCTGGCTTGTG
MDr26	216	56,5	GGCTTTCAGGAATGACCAGA	ACCACAGATCCCGACTCTTT
MDr27	271	58,8	CTTTTGAATCTGGGGGTTTGG	GGCCCGACGATGATAAGTC
MDr28	586	58,3	AGCCCCGATACACTGCCACTA	AGTCTCGAAAAAGCCCCAAGG
MDr29	455	56,2	CGGGTGTGTTTTGTTTTCTTC	CGGTCTTCTGGCGGGTAG
MDr30	185	58,0	CGTGAGGGTTTTCGGGGATTG	GAAGGCGGCTTTCGGCTTTTC
MDr31	1186	57,4	GAGTGCCGGAGTCCATCATC	AGGCGATCTTTGGGTCTGTT
MDr32	182	56,4	GGCGCAAATCCATGACGAGT	ATGGCATGACTGGGCGCTCTT
MDr33	263	56,0	TGACTGGGCGCTCTTCC	CTACTGCCAAGTCACTCACTCG

3.2.6. Primertestung

Mit 30 der 33 Primerpaare konnten PCR-Produkte erzielt werden. Nach Optimierung (siehe Abbildung 3.7) der PCR-Reaktion lieferten 21 Primerpaare spezifische PCR-Produkte von der erwarteten Basenlänge mit dem Originalstamm *D. rosae* '101', während 12 Primerpaare keine oder unspezifische PCR-Produkte amplifizierten. Von den 21 spezifischen Primerpaaren amplifizierten 14 Paare mit verschiedenen Sternrusstautämmen spezifische PCR-Produkte, während 7 nur mit dem Originalstamm Amplifikate erzeugten. Von den 14 Primerpaaren zeigten 5 monomorphe und 9 polymorphe Bandenmuster (siehe Abbildung 3.8 und Tabelle 3.12).

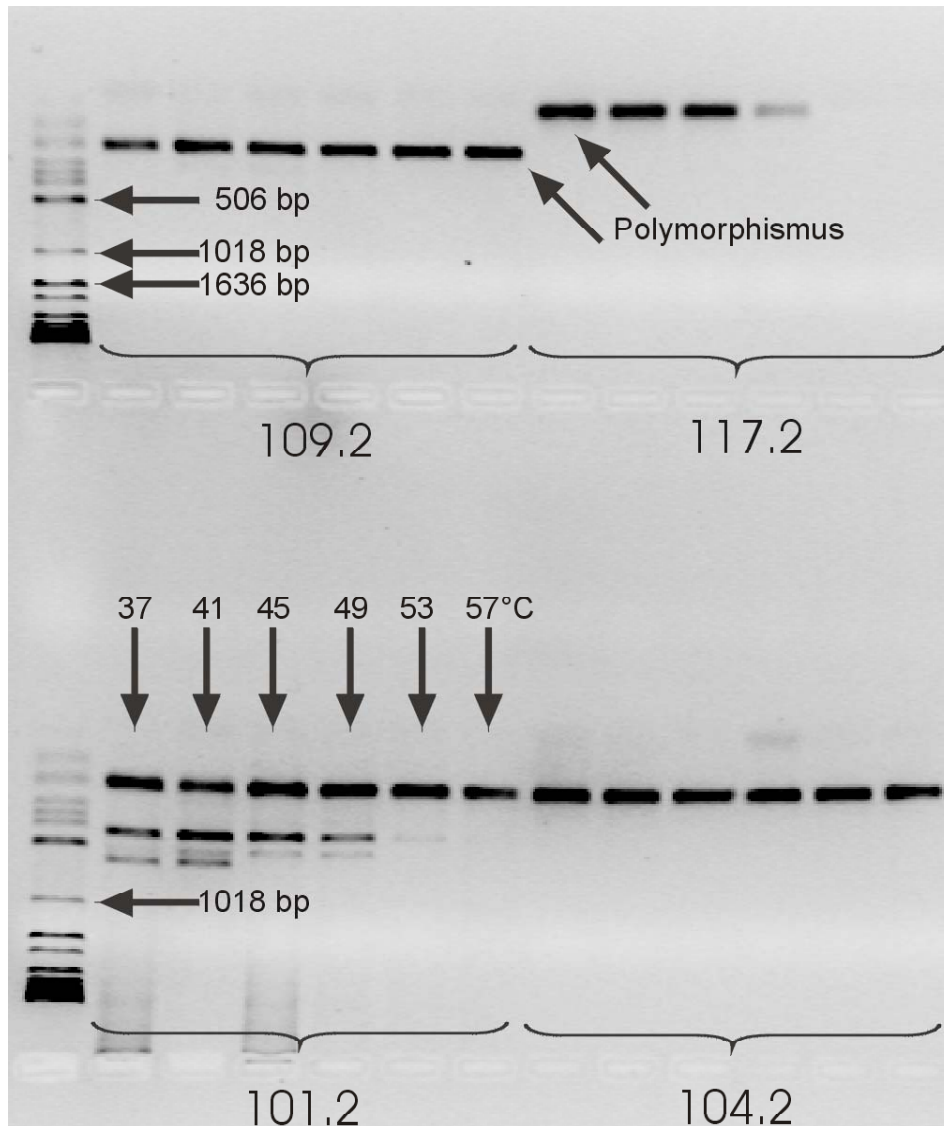


Abbildung 3.7: Optimierung der PCR-Bedingungen. Der optimale PCR-Zyklus wurde durch Variation der Annealingtemperatur im Gradientencycler ermittelt. Am Beispiel von vier unterschiedlichen Sternrusstauklonen wurden die optimale Annealings mit dem Mikrosatellitenprimerpaar MDr 18 ermittelt. Dazu wurden pro Klon 6 verschiedene Annealingtemperaturen getestet und das PCR-Produkt auf einem Agarosegel aufgetrennt. Links wurden die Proben mit den niedrigeren Annealing-Temperaturen und rechts die mit den hohen Annealing-Temperaturen aufgetragen.

Das PCR-Produkt von *D. rosae* '117' aus Belgien ist längenpolymorph im Vergleich zu dem Produkt der anderen drei *D. rosae*-Stämme, '101', '104' und '109' aus Ahrensburg.

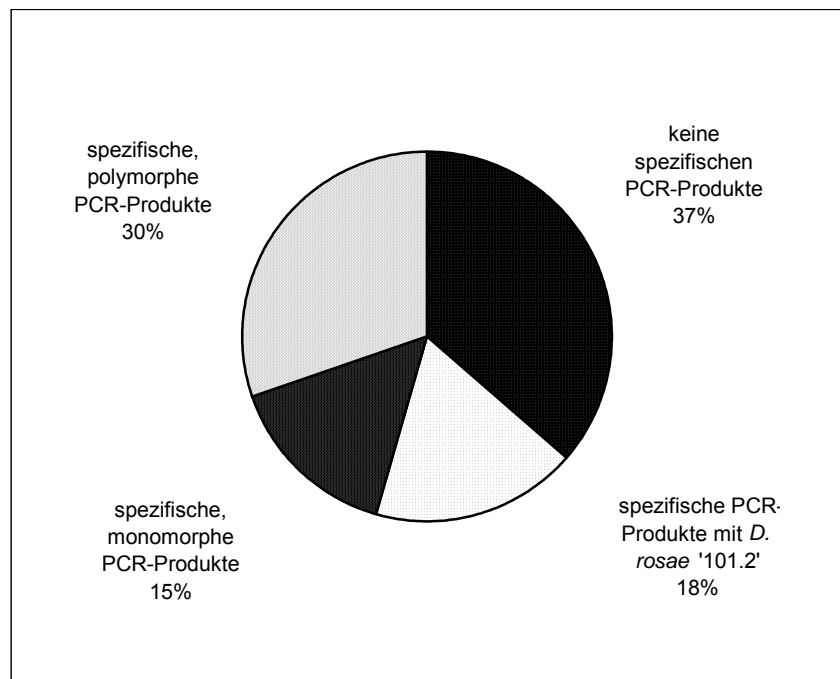


Abbildung 3.8: Testung der 33 Mikrosatellitenprimerpaare. Von den 33 Primerpaaren lieferten 30% polymorphe PCR-Produkte und sind für Populationsstudien potentiell geeignet.

Tabelle 3.12: Ergebnisse der Testung der 33 Mikrosatellitenprimerpaare.

	MDr-Primer
keine spezifischen Produkte	MDr6, MDr8, MDr13, MDr14, MDr17, MDr19, MDr22, MDr23, MDr24, MDr25, MDr27, MDr31
spezifische Produkte mit den Referenzstamm '101'	MDr2, MDr7, MDr15, MDr21, MDr28, MDr29
monomorphe Produkte	MDr1, MDr3, MDr4, MDr10, MDr32
polymorphe Produkte	MDr5, MDr9, MDr11, MDr12, MDr16, MDr18, MDr20, MDr26, MDr30, MDr33

Weitergehende Untersuchungen wurden mit dem Primerpaar MDr 5 durchgeführt. Mit den Stämmen '101', '102', '104', '109' und '114' wurden eine PCR mit dem Primerpaar MDr 5 durchgeführt und die Reaktion auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschließend wurden die DNA-Fragmente durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Mit den Stämmen '102' (aus Ahrensburg), '104' (Ahrensburg), '109' (Ahrensburg) und '114' (Holland) wird eine monomorphe Bande von 89 bp Länge amplifiziert, während mit dem

Stamm '101' (Ahrensburg) zwei unterschiedliche Fragmente amplifiziert werden. Eine Bande hat die Fragmentgröße von 89 bp und die andere von 131 bp. Die erwartete Fragmentlänge für dieses Primerpaar, berechnet aus den Sequenzdaten der DNA-Bank, beträgt 131 bp.

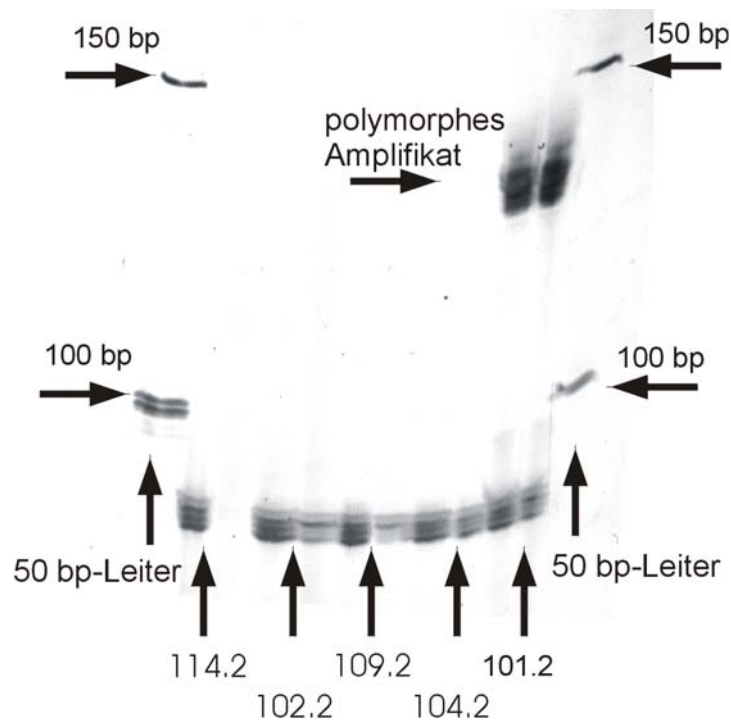


Abbildung 3.9: Auftrennung der PCR-Reaktion mittels Polyacrylamidgel und anschließender Silberfärbung. Die PCR-Reaktion wurde mit dem Primerpaar MDr 5 und den in der Abbildung angegebenen *D. rosae*-Isolaten durchgeführt. Pro *D. rosae*-Isolat wurden je 2 Spuren beladen. Die Amplifikate von den Stämmen '114' (aus Holland), '102' (Ahrensburg), '109' (Ahrensburg), '104' (Ahrensburg) sind monomorph, während der Stamm '101' (Ahrensburg) ein abweichendes Bandenmuster hervorbringt.

Um festzustellen, ob die 89 bp und 131 bp-Fragmente einen homologen Ursprung besitzen, wurde die Sequenz der PCR-Fragmente ermittelt. Dazu wurden die DNA-Fragmente von '101', '102' und '109' aus einem Agarosegel eluiert, in einen Vektor ligiert, in *E. coli* transformiert, amplifiziert, sequenziert (siehe 2.4.2.2) und anschließend untereinander verglichen.

Beim Vergleich der Sequenzen fällt die hohe Identität in den flankierenden Bereich auf (siehe Abbildung 3.10). Die Sequenzen sind nahezu identisch, abgesehen vom Mikrosatellitenbereich. In den 131 bp langen Fragmenten ist der Mikrosatelliten 52 bp lang, während in den Fragmenten mit 89 bp Länge der Mikrosatellit 10 bp lang ist.

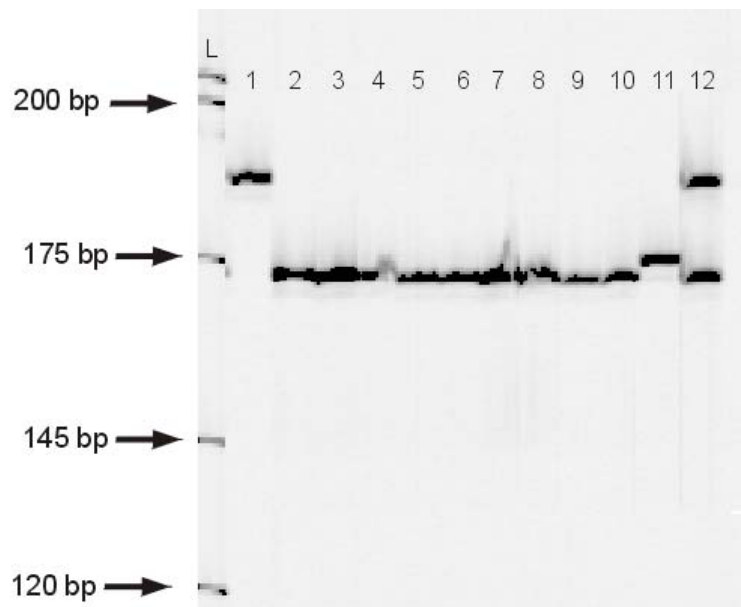


Abbildung 3.11: Mikrosatellitenanalyse von 12 *D. rosae*-Einsporisolaten.

Mit dem fluoreszenzmarkierten Primer MDr 30 wurde ein Mikrosatellitenlocus von 12 verschiedenen *D. rosae*-Einsporisolaten amplifiziert, auf Polyacrylamidgel in der Licor-Anlage aufgetragen und verglichen.

Reihenfolge der aufgetragenen Proben: L.) Basenpaarstandard, 1.) '101' (aus Ahrensburg), 2.) '123' (Zimbabwe), 3.) '127' (Berlin), 4.) '129' (Türkei), 5.) '130' (Italien), 6.) '134' (Baden-Baden), 7.) '135' (Belgien), 8.) '139' (England), 9.) '140' (England), 10.) '147' (Türkei), 11.) '151' (Australien), 12.) '114' (Holland)

3.2.8. Diversitätsanalyse von *D. rosae* aus inokulierten Blättern

Es wurden 22 (Tab. 3.15 und 3.16) verschiedene *D. rosae*-Einsporisolate getestet. Dazu wurde von infiziertem Blattmaterial Konidien abgeschwemmt und in 100 µl Puffer AP1 des Qiagen Plant Extraktionskits gelöst. Die Konzentration wurde auf 400000 Konidien pro ml eingestellt. Daraufhin wurden die Konidien mittels 30 sec Ultraschallimpuls (mit Labsonic M von Braun) bei 100% Leistung aufgeschlossen. Der Zellaufschluß wurde für 1 h bei -80°C inkubiert und anschließend wie in der Anleitung von Qiagen weiterverarbeitet. Die Elution der DNA erfolgte mit 2x 50 µl Elutionspuffer. Bei der PCR-Reaktion (siehe oben) wurde 1 µl Eluat eingesetzt, wobei die eingesetzte DNA-Menge damit unter 1 ng pro Reaktionsansatz lag.

Zwanzig der Stämme ließen sich durch die Fragmentgröße der Mikrosatelliten nicht unterscheiden und bilden eine einheitliche Gruppe (siehe Tabelle 3.15).

Zwei *D. rosae*-Strämme wichen in der Fragmentgröße mit je einen Primerpaar von der homogenen Gruppe ab (siehe Tabelle 3.16).

Tabelle 3.15: *D. rosae*-Stämme mit einheitlichem Bandenmuster

'103' (aus Ahrensburg), '108' (Gütersloh), '110' (Polen), '113' (Portugal), '116' (Polen), '117' (Belgien), '119' (Italien), '120' (Brasilien), '125' (Griechenland), '128' (Ungarn), '152' (Australien), '7701 E1' (Ahrensburg), 'Dort E4' (Dortmund), 'Elina E4' (Ahrensburg), 'Elv 13' (Ahrensburg), 'Feu 7' (Ahrensburg), 'Reg III-1' (Regensburg), 'Slyd 2' (Sparrieshoop), 'Spa A1' (Sparrieshoop)

Tabelle 3.16: *D. rosae*-Stämme mit besonderen Bandenmuster. Aufgeführt sind die *D. rosae*-Einsporkulturen, die durch die Mikrosatellitenfragmentgröße von der einheitlichen Gruppe (siehe Tabelle 3.15) unterscheidbar sind.

<i>D. rosae</i>	informative Primerpaare
'DüA3' (Düsseldorf)	MDr18
'111' (Ahrensburg)	MDr30

3.2.9. Diversitätsanalyse von *D. rosae* aus natürlich befallenen Blättern

In diesem Abschnitt wurden drei Sternrusstau-Populationen unterschiedlicher Herkünfte untersucht. Auf den Testfeldern des IZZ-Ahrensburg, der Firmen Kordes' Söhne (Sparrieshoop) und Rosenwelt Tantau (Uetersen) wurden natürlich befallene Blätter von 44 verschiedenen Genotypen getrennt gesammelt. Die Konidien wurden in Aqua bidest. aufgenommen und die Konzentration auf 1.000.000 Konidien pro ml eingestellt. Nach dem Aliquotieren wurden die Proben bei -80°C gelagert.

Für den Zellaufschluß wurden 10 µl der Konidien suspension auf einen Objektträger gegeben und die Flüssigkeit bei 90°C für 5 min verdampft. Ein zweiter Objektträger wurde aufgelegt und mit dem Daumen kräftig angepresst, so dass die Konidienzellwände zerrissen. Die so aufgeschlossenen Konidien wurden in 10 µl Aqua bidest. aufgenommen. 5 µl der Lösung wurden dem vorbereiteten PCR-Mix zugegeben.

PCR-Reaktionsansatz

5 µl Konidien-Lösung (<1 ng DNA)
 0,5 µl Primer MDr a (5 µM)
 0,5 µl Primer MDr b-800 (5 µM)
 0,5 µl dNTP (2 mM)
 1 µl PCR-Puffer (invitrogen)
 0,3 µl MgCl (50mM)
 2,1 µl Aqua. bidest.
 0,1 µl Tag-Polymerase (10U/µl)

PCR-Reaktion

1x 95°C 1'
 35x 95°C 1'
 45-65°C 1'
 72°C 1'
 1x 72°C 2'

Von den 44 unterschiedlichen *D. rosae*-Freilandsammlungen wurden mit acht Primerpaaren Mikrosatelliten-PCR's durchgeführt und auf der Licor-Anlage aufgetrennt. Von den 44 Proben bilden 28 eine homogene Gruppe (siehe Tabelle 3.17), die sich mit den MDr-Primern nicht weiter unterteilen lassen. 16 Proben (siehe Tabelle 3.18) weichen in der Analyse von dieser Gruppe ab.

Die Proben von den Versuchsfeldern der Firmen Kordes' Söhne und Rosenwelt Tantau zeigen ein einheitliches Bandenmuster, während auf den Gelände des IZZ in Ahrensburg davon abweichende Proben entdeckt wurden.

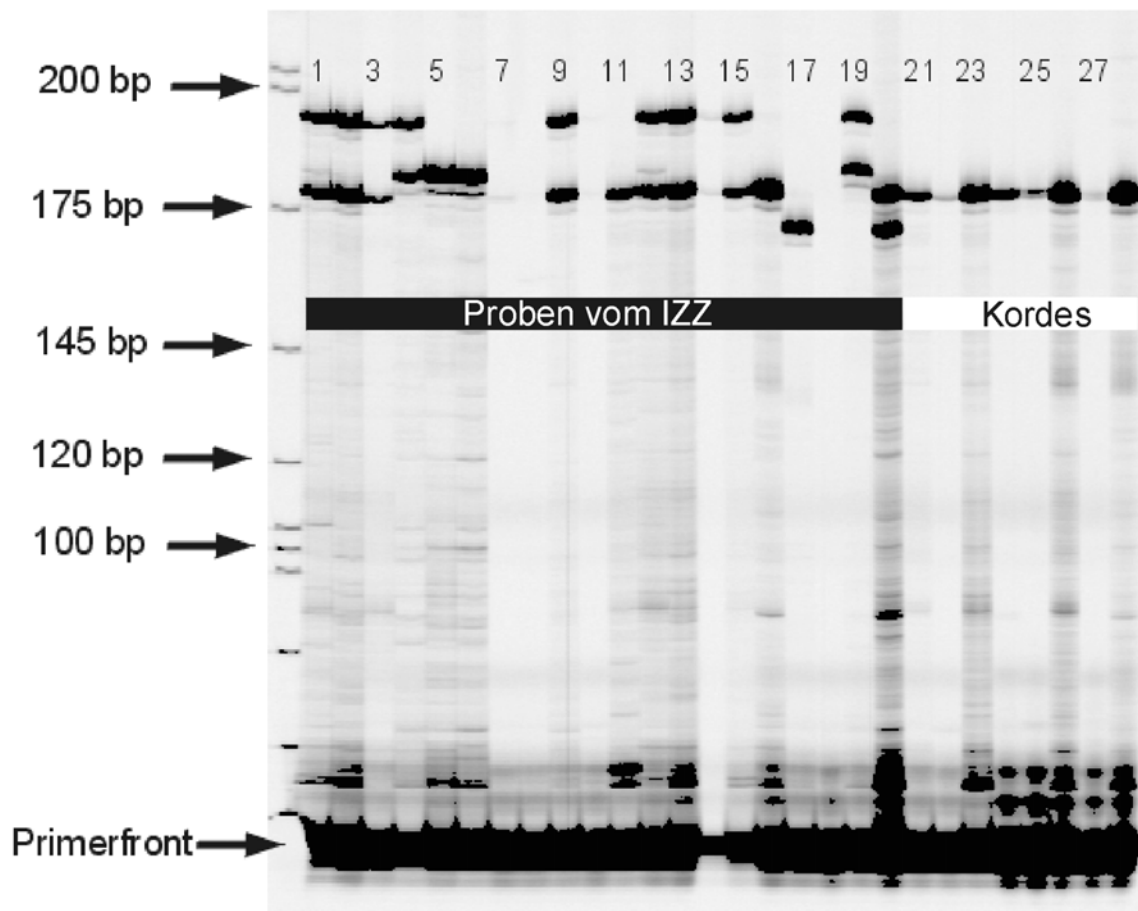


Abbildung 3.12: Mikrosatellitenanalyse von *D. rosae*-Freilandsammlung. Mit dem fluoreszenzmarkierten Primer MDr 30 wurde ein Mikrosatellit aus 44 Proben von 3 Versuchsfeldern amplifiziert, auf Polyacrylamidgel aufgetragen und miteinander verglichen. Gezeigt werden die Proben 1-28.

S: Scharberg auf den IZZ-Gelände, C: An der Chemie auf den IZZ-Gelände, B: Brennsee auf dem IZZ-Gelände, K: Versuchsfeld von Kordes und Söhne.

Reihenfolge der Proben: L.) Basenpaarstandard, 1.) 93-77-01 (S), 2.) 93-66-01 (S), 3.) 93-12-01 (S), 4.) 91-100-01 (C), 5.) 93-06-04 (C), 6.) 93-24-01 (C), 7.) 93-24-03 (C), 8.) 93-11-01 (C), 9.) 93-55-02 (S), 10.) 93-11-06 (S), 11.) 93-98-01 (S), 12.) 93-13-02 (B), 13.) 93-71-01 (B), 14.) 93-49-01 (B), 15.) 93-23-01 (B), 16.) 93-98-01 (B), 17.) 94-119-01 (B), 18.) 94-110-01 (B), 19.) 91-100-01 (B), 20.) 93-92-01 (B), 21.) Class Act (K), 22.) Golden Holstein (K), 23.) Holstein (K), 24.) Heckenfeuer (K), 25.) 99-0250-01 (K), 26.) Dic98-165 (K), 27.) 99-1521-02 (K), 28.) 99-1643-05 (K)

Tabelle 3.17.: *D. rosae*-Freilandsammlung mit einheitlichen Bandenmustern in der Mikrosatellitenanalyse. Aufgeführt sind die Wirte und deren Standorte.

Wirt	Bezeichnung	Herkunft
<i>R. villosa</i>	93-24-03	Chemie* ¹
<i>R. rubiginosa</i>	93-11-01	Chemie* ¹
<i>R. rubiginosa</i>	93-11-06	Scharberg* ¹
<i>R. vosagiaca</i>	93-98-01	Scharberg* ¹
<i>R. hybrida</i>	Class Act	Kordes* ²
<i>R. hybrida</i>	Golden Holstein	Kordes* ²
<i>R. hybrida</i>	Holstein	Kordes* ²
<i>R. hybrida</i>	Heckenfeuer	Kordes* ²
<i>R. hybrida</i>	99-0250-01	Kordes* ²
<i>R. hybrida</i>	Dic 98-165	Kordes* ²
<i>R. hybrida</i>	99-1521-02	Kordes* ²
<i>R. hybrida</i>	99-1643-05	Kordes* ²
<i>R. hybrida</i>	99-1584-01	Kordes* ²
<i>R. hybrida</i>	99-1463-01	Kordes* ²
<i>R. hybrida</i>	99-1705-07	Kordes* ²
<i>R. hybrida</i>	99-1474-02	Kordes* ²
<i>R. hybrida</i>	99-1571-01	Kordes* ²
<i>R. hybrida</i>	0229-08	Kordes* ²
<i>R. hybrida</i>	99-1788-06	Kordes* ²
<i>R. hybrida</i>	99-0237-01	Kordes* ²
<i>R. hybrida</i>	00705	Tantau* ³
<i>R. hybrida</i>	00796	Tantau* ³
<i>R. hybrida</i>	97601	Tantau* ³
<i>R. hybrida</i>	98700	Tantau* ³
<i>R. hybrida</i>	99155	Tantau* ³
<i>R. hybrida</i>	97-01371	Tantau* ³
<i>R. hybrida</i>	98697	Tantau* ³
<i>R. hybrida</i>	00816	Tantau* ³

*¹ Versuchsfeld des IZZ in Ahrensburg

*² Versuchsfeld der Firma Rosen Kordes

*³ Versuchsfeld der Firma Rosenwelt Tantau

Tabelle 3.18: *D. rosae*-Freilandsammlung mit abweichenden Bandenmustern. Aufgeführt sind die Wirte, deren Standorte und die informativen Primerpaare.

Wirt	Bezeichnung	Herkunft	informative Primerpaare
<i>R. hybrida</i> 'Jules Margottin'	93-77-01	Scharberg*	MDr30
<i>R. hybrida</i> 'Chianti'	93-66-01	Scharberg*	MDr30
<i>R. foetida</i>	93-12-01	Scharberg*	MDr30
<i>R. hybrida</i>	91-100-01	Chemie*	MDr18, MDr30, MDr33
<i>R. canina</i>	93-06-04	Chemie*	MDr18, MDr30
<i>R. mollis</i>	93-24-01	Chemie*	MDr18, MDr30, MDr33
<i>R. hybrida</i> 'Centifolia Muscosa'	93-55-02	Scharberg*	MDr30
<i>R. foetida</i> var. <i>bicolor</i>	93-13-02	Brennsee*	MDr30
<i>R. hybrida</i> 'Frühlingsgold'	93-71-01	Brennsee*	MDr30
<i>R. woodsii</i> var. <i>fendleri</i>	93-49-01	Brennsee*	MDr30
<i>R. micrantha</i>	93-23-01	Brennsee*	MDr30
<i>R. hybrida</i> 'Roselina'	93-98-01	Brennsee*	MDr30
<i>R. hybrida</i> 'Complicata'	94-119-01	Brennsee*	MDr30, MDr33
<i>R. mollis</i>	94-110-01	Brennsee*	MDr18, MDr30
<i>R. hybrida</i>	91-100-01	Brennsee*	MDr18, MDr30, MDr33
<i>R. hybrida</i> 'Tuscany'	93-92-01	Brennsee*	MDr30, MDr33

* Versuchsfeld des IZZ in Ahrensburg

3.2.10. *D. rosae* mit auffälligem Bandenmuster

In den drei vorhergehenden Abschnitten (3.2.7. bis 3.2.9) wurde über Versuche zur Analyse von Einsporisolate und Freilandproben mit den Mikrosatellitenmarkern berichtet. In den einzelnen Versuchsteilen wurde jeweils eine große, nicht weiter unterteilbare Gruppe mit einheitlichem Bandenmuster festgestellt. Von dieser Gruppe unterscheidbar sind einzelne Proben und Isolate. Diese abweichenden Proben und Isolate bilden keine einheitliche Gruppe. Sie können durch die MDr-Primer in weitere Gruppen unterteilt werden.

Die abweichenden Proben und Isolate sind in Tabelle 3.19 mit den informativen MDr-Primer zusammengestellt. Auf dem Gelände des IZZ wurden 19 Proben gesammelt, die in die abweichende Gruppe eingeordnet werden. Auf den beiden anderen Testfeldern wurden keine Abweichenden festgestellt.

Tabelle 3.19: Von der homogenen Gruppe abweichende *D. rosae*-Einsporisolate und Freilandproben. Die informativen Primerpaare sind mit einem + gekennzeichnet.

Isolat/S [#]	Wirt	Wirtsbezeichnung	Herkunft	MDr-Primerpaare										
				5	9	11	16	18	20	26	28	30	33	
'101'	<i>R. hybrida</i>	91-100-5	Chemie*	+	+	+	+			+	+		+	+
'109'	<i>R. hybrida</i> 'Chianti'	93-66-01	Scharberg*								+			
'111'	<i>R. hybrida</i> 'Pompon de Bourgogne'	93-53-01	Scharberg*											+
'114'			Holland								+			+
'117'			Belgien						+					
'134'	<i>R. hybrida</i> 'Heimatmelodie'		Baden-Baden										+	
'151'	<i>R. hybrida</i> 'French Lace'		Australien					+						+
'DüA3'			Düsseldorf						+					
S [#]	<i>R. hybrida</i> 'Jules Margöttin'	93-77-01	Scharberg*											+
S [#]	<i>R. hybrida</i> 'Chianti'	93-66-01	Scharberg*											+
S [#]	<i>R. foetida</i>	93-12-01	Scharberg*											+
S [#]	<i>R. hybrida</i>	91-100-01	Chemie*						+				+	+
S [#]	<i>R. canina</i>	93-06-04	Chemie*						+					+
S [#]	<i>R. mollis</i>	93-24-01	Chemie*						+				+	+
S [#]	<i>R. hybrida</i> 'Centifolia Muscosa'	93-55-02	Scharberg*											+
S [#]	<i>R. foetida</i> var. <i>bicolor</i>	93-13-02	Brennsee*											+
S [#]	<i>R. hybrida</i> 'Frühlingsgold'	93-71-01	Brennsee*											+
S [#]	<i>R. woodsii</i> var. <i>fendleri</i>	93-49-01	Brennsee*											+
S [#]	<i>R. micrantha</i>	93-23-01	Brennsee*											+
S [#]	<i>R. hybrida</i> 'Roselina'	93-98-01	Brennsee*											+
S [#]	<i>R. hybrida</i> 'Complicata'	94-119-01	Brennsee*											+
S [#]	<i>R. mollis</i>	94-110-01	Brennsee*						+					+
S [#]	<i>R. hybrida</i>	91-100-01	Brennsee*						+					+
S [#]	<i>R. hybrida</i> 'Tuscany'	93-92-01	Brennsee*											+

S[#] Sammelmuster

* Versuchsfeld des IZZ in Ahrensburg

3.2.11. Populationsstruktur von *Diplocarpon rosae*

Aufgrund der Mikrosatellitenanalyse können die Einsporisolate (Tab. 3.13, 3.15, 3.17 und 3.19) in 8 Gruppen unterteilt werden (siehe Abb. 3.13). Dazu wurden die Differentialmerkmale aus Tabelle 3.20. mit der Software NTSYSpc (Version 2.10s) ausgewertet. Verwendet wurde die Routine simqual mit dem JACCARD (1908)-Index und für die Erstellung des Stammbaumes die Routine sahn mit der UPGMA-Clustering-Methode. Anschließend wurden die einzelnen Gruppen für die bessere Übersichtlichkeit von 1 bis 8 nummeriert.

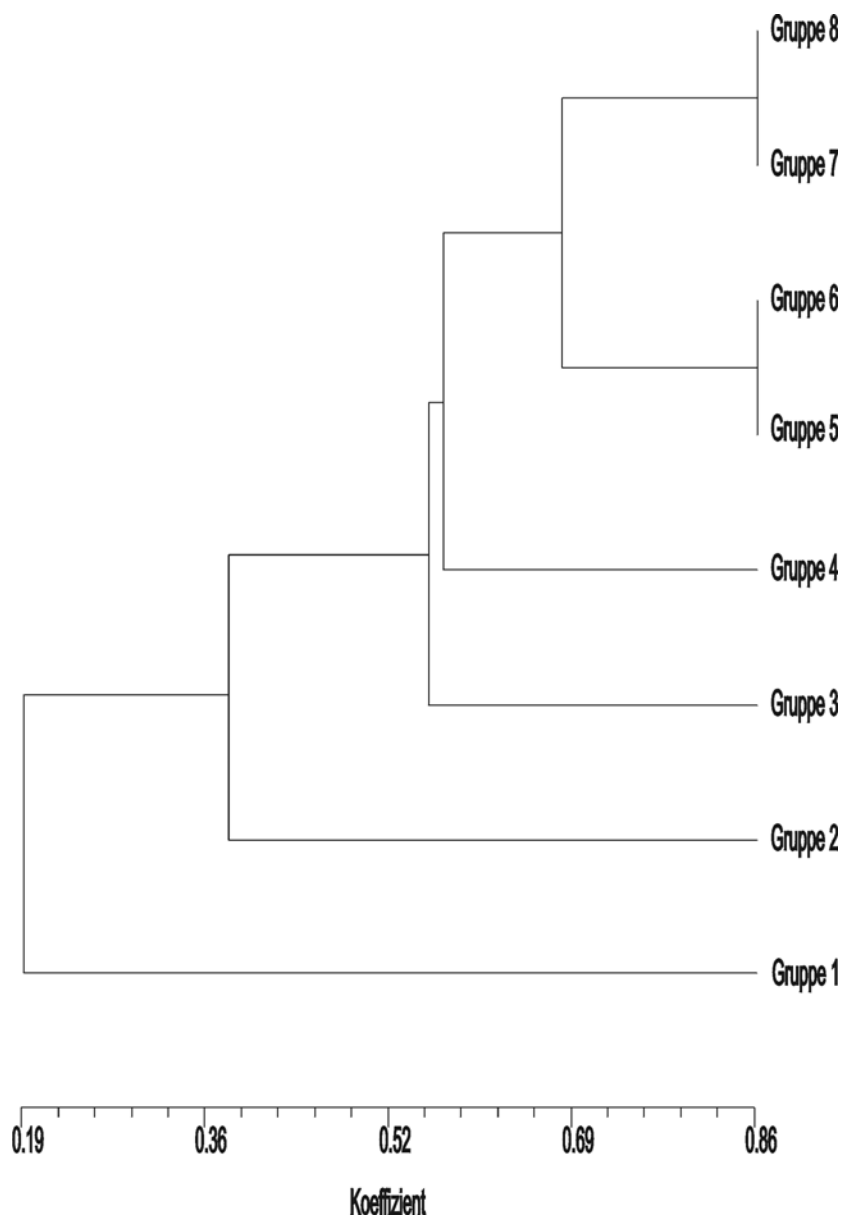


Abb. 3.13: Stammbaum von *D. rosae*-Einsporisolaten unterschiedlicher Herkunft basierend auf dem Bandenmuster der Mikrosatellitenanalyse.

Tab. 3.20. Differentialmerkmale der acht *D. rosae*-Gruppen

MDr-Primerpaar	Fragmentgröße	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6	Gruppe 7	Gruppe 8
33	263	1	0	0	0	0	0	0	0
33	256	0	1	1	1	1	1	1	1
30	185	1	0	0	0	1	0	0	1
30	177	0	1	0	0	0	0	0	0
30	175	0	0	1	1	1	1	1	1
28	207	0	0	1	0	0	0	0	0
28	197	1	1	0	1	1	1	1	1
26	262	1	1	1	1	1	1	0	0
26	213	0	0	0	0	0	0	1	1
20	130	1	0	0	0	0	0	0	0
18	215	1	1	1	0	1	1	1	1
18	183	0	0	0	1	0	0	0	0
16	274	0	0	1	1	1	1	1	1
16	271	1	1	0	0	0	0	0	0
11	224	1	0	0	0	0	0	0	0
9	116	1	0	0	0	0	0	0	0
9	86	1	0	0	0	0	0	0	0
5	131	1	0	0	0	0	0	0	0
5	90	1	1	1	1	1	1	1	1

Gruppe 1: *D. rosae*-Stämme aus dieser Gruppe zeigten die größten Abweichungen im Bandenmuster im Vergleich zu den anderen *D. rosae*-Stämmen. In diese Gruppe gehört der Stamm '101', isoliert von der R. 91-100-5 vom IZZ-Gelände in Ahrensburg. Die Charakterisierung dieser Gruppe kann durch verschiedene Kombinationen von Primerpaaren erfolgen, z.B. durch MDr 26, MDr 30 und MDr 33.

Gruppe 2: Die Gruppe wird charakterisiert durch das Primerpaar MDr 16 und MDr 30. In diese Gruppe gehört das Einsporisolat '151' aus Australien.

Gruppe 3: Die Gruppe wird charakterisiert durch das Primerpaar MDr 28. In diese Gruppe gehört das Einsporisolat '134' aus Baden-Baden.

Gruppe 4: Die Gruppe wird charakterisiert durch das Primerpaar MDr 18. In diese Gruppe gehören das Einsporisolat 'DüA3' aus Düsseldorf und das Einsporisolat '117' aus Belgien.

Gruppe 5: Die Gruppe wird charakterisiert durch das Primerpaar MDr 30. In diese Gruppe gehört das Einsporisolat '111' aus Ahrensburg.

Gruppe 6: Der Großteil der untersuchten Einsporisolate gehört dieser Gruppe an (Tab. 3.13 und 3.15). Die Gruppe ist charakterisiert durch die Kombination der Primerpaare MDr 16, MDr 18, MDr 26, MDr 28, MDr 30. Die Verbreitung ist weltweit mit Fundorten z.B. in Deutschland, England, Italien, Türkei, Polen, Zimbabwe, Indien, Australien.

Gruppe 7: Die Gruppe wird charakterisiert durch das Primerpaar MDr 26. In diese Gruppe gehört ein Einsporisolat '109' aus Ahrensburg.

Gruppe 8: Die Gruppe wird charakterisiert durch das Primerpaar MDr 26 und MDr 30. In diese Gruppe gehört das Einsporisolat '114' aus Holland.

3.3. Molekularbiologische Untersuchungen an *Diplocarpon*

3.3.1. Übertragbarkeit der Mikrosatellitenmarker auf andere *Diplocarpon*-Arten

In diesem Abschnitt wird mitgeteilt, in wie weit sich die MDr-Primer auf andere *Diplocarpon*-Arten übertragen lassen. Dazu wurden die PCR-Fragmente auf Polyacrylamidgel in der Licor-Anlage aufgetrennt. Mit fünf verschiedenen Primerpaaren konnten klare, auswertbare Fragmente amplifiziert werden. Mit den anderen getesteten Primerpaaren wurden keine Banden bzw. ein multiples, nicht auszuwertendes Bandenmuster amplifiziert.

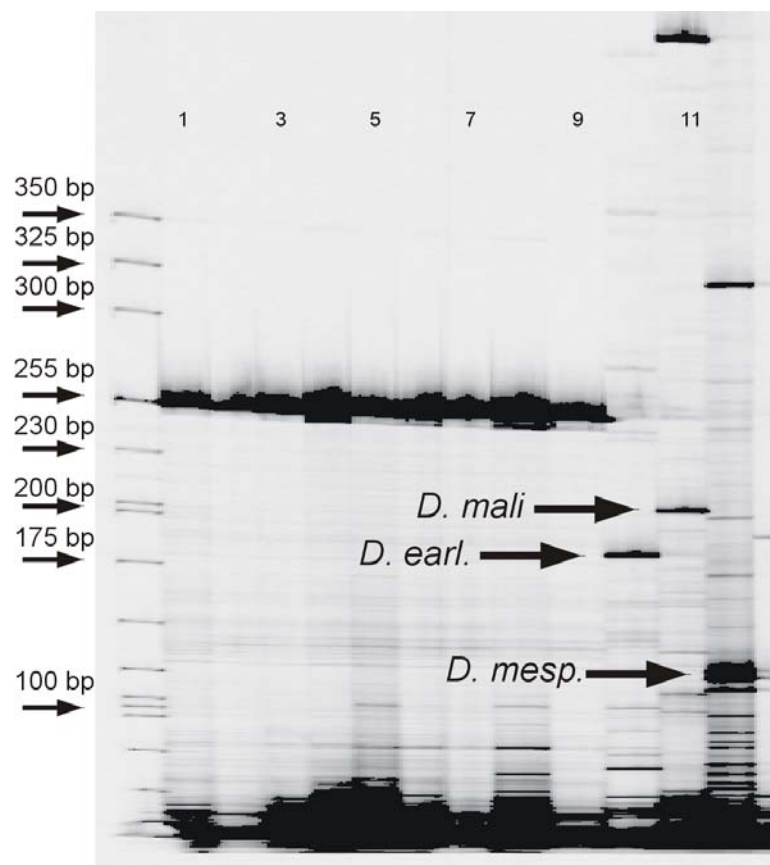
Mit den fünf erfolgreich übertragbaren Primerpaaren wurden klare Banden amplifiziert, deren Fragmentgröße von den der *D. rosae*-Stämme abweichen (siehe Tabelle 3.21). Außerdem amplifizieren diese Primer bei den drei untersuchten *Diplocarpon*-Arten nicht nur jeweils ein Fragment, sondern zeigen eine Tendenz zu multiplen Bandenmustern (siehe Abbildung 3.14).

Tabelle 3.21: Übertragbarkeit der MDr-Primer auf andere *Diplocarpon* Arten

Primer	<i>Diplocarpon</i> arten			
	<i>D. earlianum</i>	<i>D. mali</i>	<i>D. mespili</i>	<i>D. rosae</i>
MDr 5	K	K	K	131 bp
MDr 9	M	M	M	116 bp
MDr 11	M	M	M	224 bp
MDr 16	265 bp	253 bp	253 bp	277 bp
MDr 18	169 bp	159 bp	205 bp	213 bp
MDr 20	K	K	K	130 bp
MDr 26	K	K	K	216 bp
MDr 28	-	529 bp, 465 bp	390 bp	586 bp
MDr 30	155 bp	155 bp	150 bp	185 bp
MDr 33	179 bp	200 bp	117 bp	263 bp

K: kein Amplifikat

M: multiples Bandenmuster

Abb.3.14: Vergleich der Bandenmuster von *D. rosae*-Isolaten mit den Bandenmustern der 3 weiteren untersuchten *Diplocarpon*-Arten. Es wurde eine PCR mit den Primerpaar MDr 33 durchgeführt und auf dem Licor-Sequenzier aufgetrennt.

Reihenfolge der Proben: Licor-Basenpaarleiter, 1.) *D. rosae* '109' (aus Ahrensburg), 2.) '114' (Holland), 3.) '117' (Belgien), 4.) '140' (England), 5.) '141' (Frankreich), 6.) '142' (Frankreich), 7.) '143' (Japan), 8.) 'Dort E4' (Dortmund), 9.) '121' (Indien), 10.) *D. earlianum*, 11.) *D. mali*, 12.) *D. mespili*

3.3.2. AFLP-Analyse von *Diplocarpon* auf Art- und Gattungsebene

Um die Gründe für die große Distanz vom Stamm '101' zu den anderen Stämmen in der Mikrosatellitenanalyse zu erschließen (Abb. 3.13), wurde die AFLP-Technik verwendet.

Bei der Anwendung der AFLP-Technik ist die Qualität der eingesetzten DNA von essentieller Bedeutung. Bei z.B. verunreinigter DNA kann es zu partiellen Verdau der DNA kommen, was in der Endreaktion zu Artefakten führt.

Im ersten Schritt wurde deshalb die Reproduzierbarkeit der AFLP-Technik bei den verwendeten DNA-Proben überprüft. Dafür wurde die AFLP-Reaktion mit der DNA von zwölf Pilzstämmen durchgeführt (Abb. 3.15). Um die Reproduzierbarkeit zu verifizieren, wurden unabhängig von dieser zwei AFLP-Präparation wiederholt. Mit der DNA vom Stamm '128' sowie '101' wurde 3-mal unabhängig voneinander die AFLP-Reaktion, vom Verdau bis zur Endreaktion, durchgeführt. Während bei dem Stamm '128' DNA aus einer Isolierung verwendet wurde, wurde vom Stamm '101' zusätzlich eine zweite DNA-Isolierung vorgenommen.

Die AFLP-Endreaktion ergab bei Stamm '128' in allen drei Fällen ein identisches Bandenmuster. Auch die Bandenmuster vom Stamm '101' war in allen drei Fällen identisch (siehe Abb. 3.15).

Die Endreaktion ergab ein Bandenmuster, dass eine Auswertung im Bereich von 50 bp bis 350 bp erlaubte. Bei den Stämmen '117' und '120' bricht die Reaktion bei etwa 150 bp ab, so dass diese beiden Stämme nicht ausgewertet wurden.

Anschließend wurde mit 10 (siehe Tab. 3.22) der 12 Pilzstämmen die Analyse mit der AFLP-Technik durchgeführt.

Mit den 13 Primerpaarkombinationen (Tab. 2.4) konnten 554 Bandenpositionen ausgewertet werden. Die Anzahl der Banden pro Genotyp beträgt zwischen 140 und 205 (siehe Tabelle 3.22).

Die Anzahl der bei allen Genotypen aufgetretenen identischen Banden liegt bei 5. Betrachtet man nur die Art *Diplocarpon rosae*, so beträgt die Anzahl der gemeinsamen Banden 25. Betrachtet man die 7 *D. rosae*-Stämme, ohne den Stamm '101', so haben diese 103 Banden gemeinsam.

Die Anzahl der identischen Banden vom Stamm '101' liegen im Vergleich mit denen der anderen Stämmen bei 33 bis 40. 33 Banden hat der Stamm '101' mit *D. rosae* '141' und *D. mespili* gemeinsam, 36 mit den Stämmen '121' und '123', 38 mit den Stämmen '140', '142' und '152' und 40 mit den Stämmen '128' und *D. earlianum*.

Zur Ermittlung des Polymorphiegrades wurde der Quotient aus der Anzahl der gemeinsamen Banden mit der Summe aus den gemeinsamen und differenzierenden Banden gebildet. Die Werte wurden für alle Kombinationen errechnet und in eine Ähnlichkeitsmatrix eingefügt (siehe Tabelle 3.23).

Die Ähnlichkeit zwischen den Stämmen hat den Wert von 0,076 bis 0,969. Die *D. rosae*-Stämme, betrachtet ohne den Stamm '101', weisen eine große Ähnlichkeit mit Werten von 0,685 bis 0,969 auf. Die Ähnlichkeiten zwischen dem Stamm '101' und den anderen *D. rosae*-Stämmen liegen zwischen 0,117 und 0,133.

Die Stämme *D. rosae* '101', *D. earlianum* und *D. mespili* haben nur eine geringe Ähnlichkeit zu den anderen Stämmen, während die Stämme *D. rosae* '121', '123', '128', '140', '141', '142', '152' eine größere Ähnlichkeit zueinander aufweisen.

Im nächsten Schritt wurde mit dem Softwareprogramm NTSYSpC ein Stammbaum berechnet. Verwendet wurde die Routinen „simgend“ und „sahn“ zur Erstellung eines Stammbaumes. In der Routine „simgend“ wurde die Rechenoperation „Band“, beruhend auf LYNCH (1990) mit der Standardeinstellung verwendet. Die Erstellung des Stammbaumes erfolgte mit „sahn“, wobei die Standardeinstellung mit der UPGMA-Methode gewählt wurde.

Im Stammbaum (Abb. 3.16) ist zu erkennen, dass die *D. rosae*-Stämme, ohne den Stamm '101', ein Cluster mit niedriger Differenz im Koeffizientwert bilden. Diese Stämme weisen eine hohe Ähnlichkeit zwischen den Bandenmustern auf. Die Stämme *D. rosae* '101', *D. earlianum* und *D. mespili* liegen außerhalb des Clusters und haben eine geringe Ähnlichkeit im Bandenmuster, sowohl zueinander als auch zu den anderen *D. rosae*-Stämmen (siehe Abbildung 3.16).

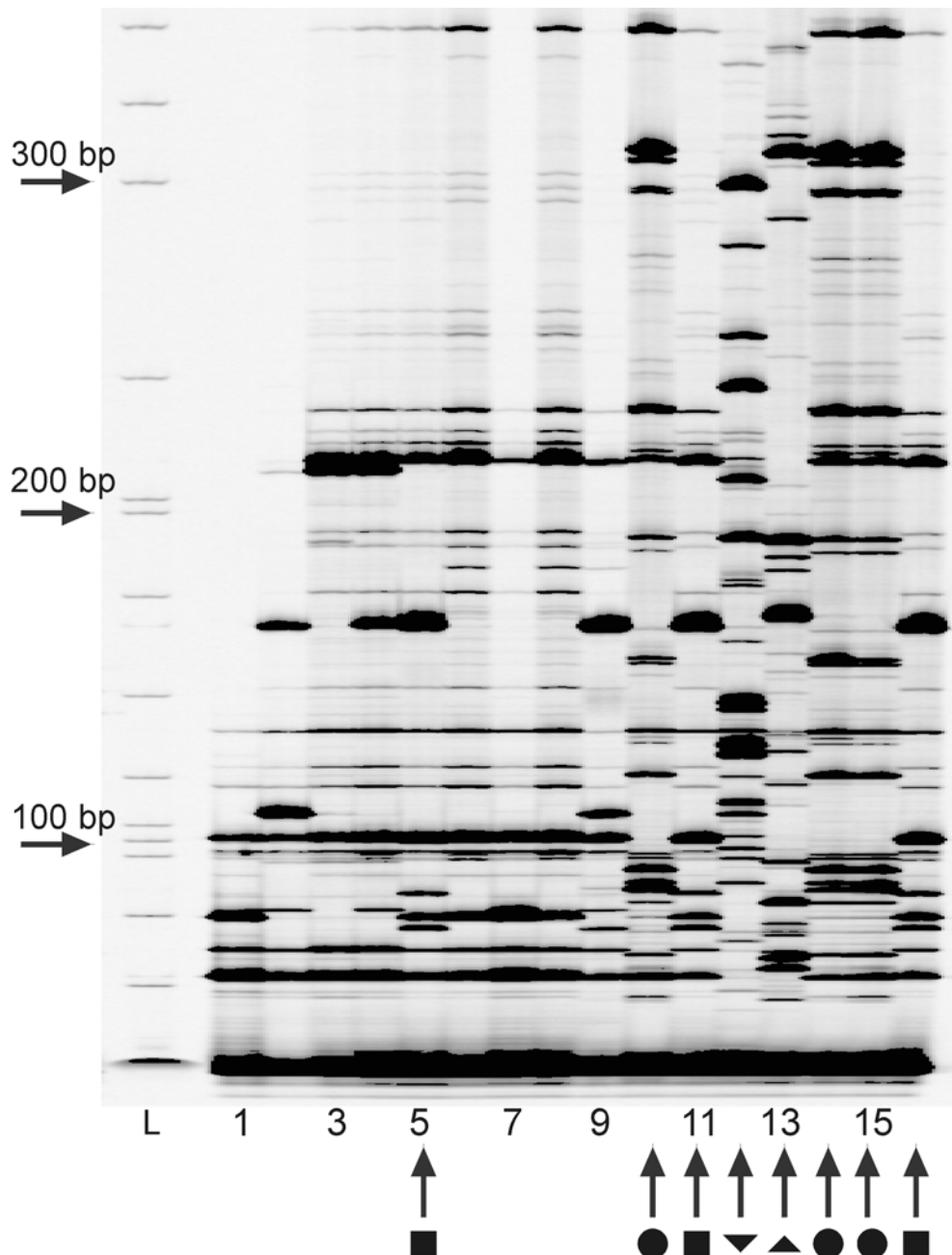


Abbildung 3.15: Überprüfung der AFLP-Reaktion mit 12 verschiedenen *D. rosae*-Isolaten sowie *D. earlianum* und *D. mespili*. Die AFLP-Reaktion wurde mit der Primerkombination HindIII-CGA/MseI-GTG durchgeführt.

Die PCR-Reaktion von Spur 1 und 2 amplifizierte nur kurze Fragmente, so dass die zwei *D. rosae*-Isolate nicht in die Auswertung aufgenommen wurden. Die DNA vom *D. rosae*-Stamm '128' wurde dreimal unabhängig voneinander für die AFLP-Reaktion präpariert und die Endreaktionen auf den Spuren 5.), 11.) und 16.) aufgetragen. Alle drei Präparationen ergaben ein einheitliches Bandenmuster.

Vom Stamm *D. rosae* '101' wurden zwei voneinander unabhängige DNA-Isolierungen und mit einer von diesen wurden zwei unabhängige AFLP-Präparationen durchgeführt. Das Bandenmuster ist in allen drei Spuren identisch.

Reihenfolge der aufgetragenen Proben: L.) Basenpaarstandard, 1.) '117' (aus Belgien), 2.) '120' (Brasilien), 3.) '121' (Indien), 4.) '123' (Zimbabwe), 5.) '128' (Ungarn), 6.) '140' (England), 7.) '141' (Frankreich), 8.) '142' (Frankreich), 9.) '152' (Australien), 10.) '101' (Ahrensburg), 11.) '128', 12.) *D. earlianum*, 13.) *D. mespili*, 14.) '101', 15.) '101', 16.) '128'

Tabelle 3.22: Anzahl der Banden aus den 13 AFLP-Reaktionen in Abhängigkeit vom Pilzstamm bzw. Isolat. '101' (aus Ahrensburg), '121' (Indien), '123' (Zimbabwe), '128' (Ungarn), '140' (England), '141' (Frankreich), '142' (Frankreich), '152' (Australien) und *D. earlianum* und *D. mespili*.

Isolat	Anzahl der Banden
<i>D. rosae</i> '101'	176
<i>D. rosae</i> '121'	153
<i>D. rosae</i> '123'	157
<i>D. rosae</i> '128'	165
<i>D. rosae</i> '140'	157
<i>D. rosae</i> '141'	140
<i>D. rosae</i> '142'	156
<i>D. rosae</i> '152'	165
<i>D. earlianum</i>	205
<i>D. mespili</i>	154
gesamt	554

Tabelle 3.23: Ähnlichkeitsmatrix zwischen den 10 *Diplocarpon*-Stämmen

	101	121	123	128	140	141	142	152	earl.	mes.
<i>D. rosae</i> '101'	1									
<i>D. rosae</i> '121'	0,123	1								
<i>D. rosae</i> '123'	0,121	0,856	1							
<i>D. rosae</i> '128'	0,133	0,719	0,789	1						
<i>D. rosae</i> '140'	0,129	0,771	0,826	0,83	1					
<i>D. rosae</i> '141'	0,117	0,694	0,768	0,723	0,747	1				
<i>D. rosae</i> '142'	0,129	0,756	0,82	0,824	0,969	0,751	1			
<i>D. rosae</i> '152'	0,125	0,728	0,731	0,755	0,76	0,685	0,754	1		
<i>D. earlianum</i>	0,117	0,129	0,131	0,135	0,124	0,131	0,128	0,121	1	
<i>D. mespili</i>	0,111	0,085	0,08	0,089	0,08	0,089	0,076	0,085	0,078	1

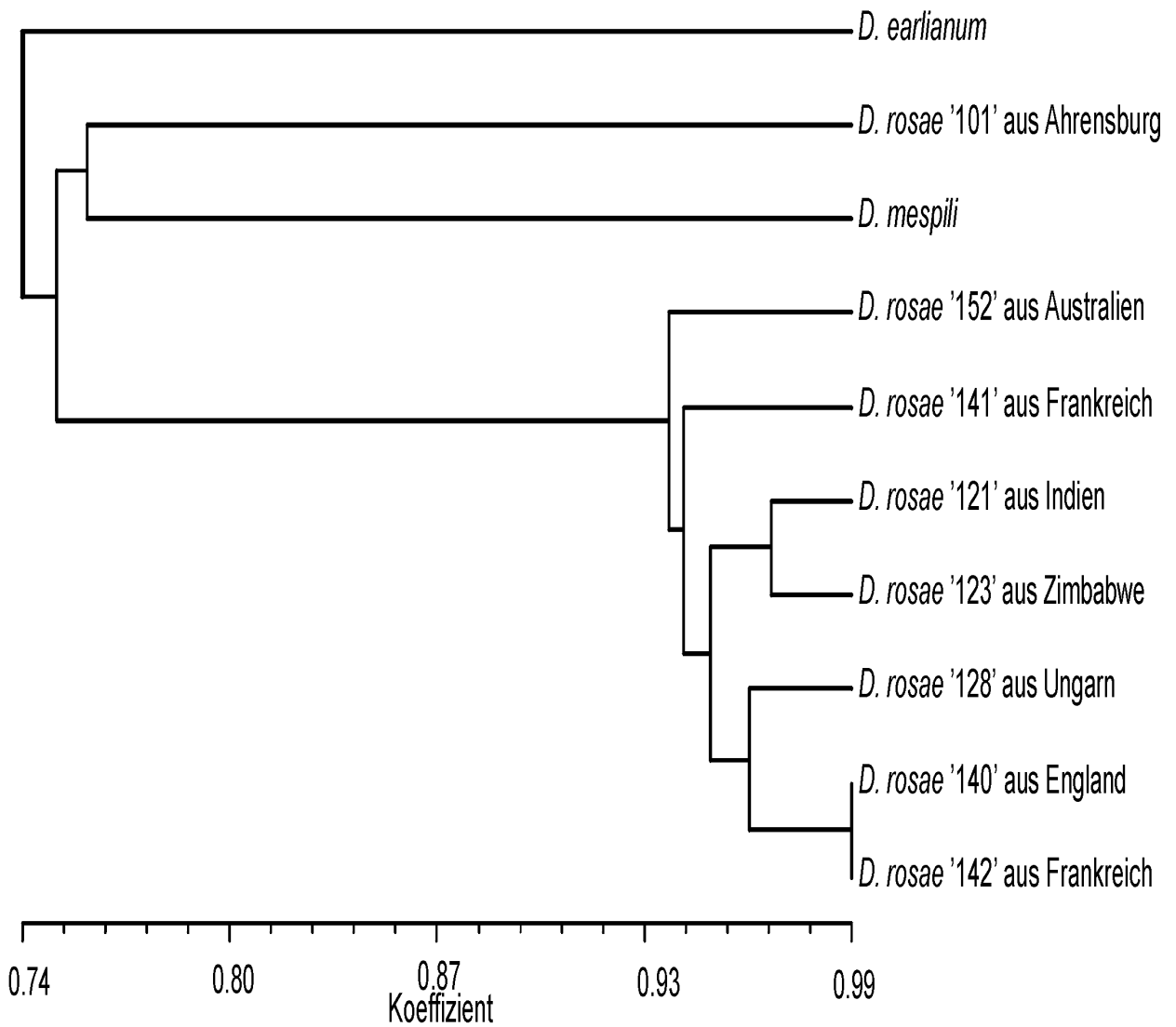


Abbildung 3.16: Stammbaum von 10 *D. rosae*-Stämmen sowie *D. earlianum* und *D. mespili* basierend auf AFLP-Markern. *D. rosae*, ohne den Stamm '101', bildet einen einheitlichen Cluster mit hoher Ähnlichkeit zwischen den Stämmen. Der Stamm *D. rosae* sowie *D. earlianum* und *D. mespili* weichen von diesen Stämmen erheblich ab.

3.3.3. Analyse der rDNA zur Ermittlung der Diversität von *D. rosae* sowie der Phylogenie der Gattung *Diplocarpon*

Da die Distanz zwischen dem Stamm '101' und den übrigen untersuchten Stämmen sowohl in der Mikrosatelliten- als auch in der AFLP-Analyse sehr groß ist, sollte die Frage geklärt werden, ob dieser Stamm *D. rosae* zuzuordnen ist, oder ob es sich um eine andere Art handelt. Dazu wurden Sequenzdaten von rDNA-Abschnitten ermittelt und verglichen.

3.3.4. Variationen im Bereich der rDNA bei *Diplocarpon*

Analysiert wurde ein Bereich der von den Primern NS7 und LS266 flankiert wird. Die Länge des PCR-Fragmentes zwischen den Primer NS7 und LS266 (siehe Abbildung 3.17) beträgt für die *D. rosae*-Stämme '117', '120' und '121' 1256 bp, wobei 364 bp auf den 18s-Bereich, 179 auf den ITS1, 159 auf den 5,8s, 152 auf den ITS2 und 402 bp auf den 28s-Bereich entfallen. Die Fragmentlänge bei *D. earlianum* beträgt 1258, bei *D. mali* 1245 und bei *D. mespili* 1252 bp.

Für die direkte Sequenzierung des rDNA-Abschnittes wurden das innenliegende Primerpaar Oli12 und IST4 verwendet. Das entsprechende PCR-Fragment, amplifiziert vom Stamm '121', hat eine Länge von 891 bp. Die endterminalen Abschnitte der Sequenz lassen sich aus technischen Gründen nicht fehlerfrei auslesen, so dass ein Bereich von 765 bp für die Auswertung genutzt wurde.

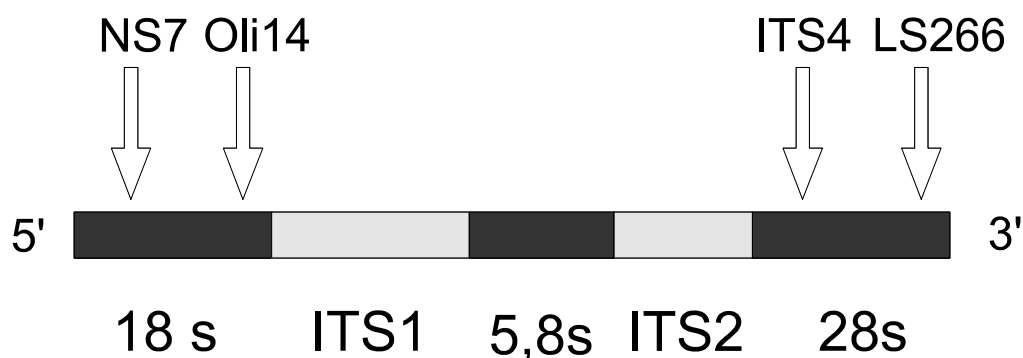


Abbildung 3.17: Primerbindungsstellen auf dem rDNA-Abschnitt für die Primer NS7, Oli14, ITS4 und LS266

Von den drei *D. rosae*-Stämmen ('117', '120' und '121') sowie den anderen drei untersuchten *Diplocarpon*-Arten wurden je drei rDNA-Klone sequenziert. Die Sequenzen wurden aufgearbeitet und ein Alignment durchgeführt. Dazu wurde an 25 Positionen gaps eingefügt. Anschließend wurden das Alignment zu vergleichenden Untersuchungen verwendet.

Als erstes wurden die Sequenzen auf Variationen innerhalb der Stämme untersucht. In den rDNA-Abschnitten der sechs *Diplocarpon*-Stämme sind keine Variationen innerhalb der Genotypes gefunden worden.

Vergleiche zwischen den analysierten sechs Stämmen ergeben Variationen in der rDNA-Sequenz zwischen den Pilzstämmen. Diese Variationen können zum einen auf Basenaustausche und zum anderen auf Insertions- bzw. Deletions-Ereignisse zurückgeführt werden.

In dem 765 Basen langen Abschnitt sind 110 Positionen zwischen den 6 Stämmen variabel, von den 42 nach dem Parsimony-Prinzip informativ sind (siehe Tabelle 3.24).

Die Variabilität in den einzelnen Sequenzabschnitten ist unterschiedlich groß. Um das Maß der Variation in Abhängigkeit vom Sequenzabschnitt zu bestimmen, wurde die Sequenz in die Abschnitte 18s, ITS1, 5,8s, ITS2 und 28s unterteilt und die einzelnen variablen Positionen bestimmt. Die Abschnitte 18s und 5,8s sind konservativ mit wenigen Variationen, während die Abschnitte ITS1 und ITS2 eine wesentlich höhere Variabilität aufweisen (siehe Tabelle 3.24).

Tabelle 3.24: Variation im rDNA-Abschnitt innerhalb der Gattung *Diplocarpon* basierend auf drei *D. rosae* und je einem Stamm von *D. earlianum*, *D. mali* und *D. mespili*.

Sequenzabschnitt	Länge	Variabel	Informativ	gap
18 s	264	3	1	4
ITS1	179	58	22	17
5,8 s	159	4	1	1
ITS2	152	45	18	3
28 s	11	0	0	0
Gesamt	765	110	42	25

3.3.5. Diversität von *D. rosae* und intragenerische Verwandtschaft ermittelt mit Hilfe der rDNA-Analyse

Im nächsten Schritt wurden sieben weitere Pilzstämmen (s. Tab. 3.25) aus der direkten Sequenzierung hinzugefügt, auf den oben erwähnten Bereich zugeschnitten und erneut einem Alignment unterzogen. Mit dem Programm dnadist wurde eine Distanzmatrix erstellt, um die Variation innerhalb der Gattung *Diplocarpon* mit besonderer Berücksichtigung von *D. rosae* zu ermitteln (siehe Tabelle 3.25).

Tabelle 3.25: Intragenerische Distanzmatrix der Gattung *Diplocarpon* basierend auf den rDNA-Bereich. '101' (aus Ahrensburg), '102' (Ahrensburg), '104' (Ahrensburg), '109' (Ahrensburg), '114' (Holland), '117' (Belgien), '118' (Cottbus), '120' (Brasilien), '121' (Indien), '123' (Zimbabwe)

	'101'	'102'	'104'	'109'	'114'	'117'	'118'	'120'	'121'	'123'	MALI*	EARL*	MESP*
'101'	0.0000	0.0297	0.0284	0.0297	0.0297	0.0311	0.0297	0.0311	0.0297	0.0297	0.0750	0.0939	0.1164
'102'		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0092	0.0000	0.0092	0.0066	0.0013	0.0795	0.0890	0.1208
'104'			0.0000	0.0000	0.0000	0.0079	0.0000	0.0079	0.0053	0.0000	0.0782	0.0891	0.1194
'109'				0.0000	0.0000	0.0105	0.0000	0.0105	0.0066	0.0026	0.0808	0.0903	0.1220
'114'					0.0000	0.0092	0.0000	0.0092	0.0066	0.0013	0.0795	0.0890	0.1208
'117'						0.0000	0.0092	0.0000	0.0013	0.0092	0.0777	0.0858	0.1143
'118'							0.0000	0.0092	0.0066	0.0026	0.0794	0.0890	0.1208
'120'								0.0000	0.0013	0.0092	0.0777	0.0858	0.1143
'121'									0.0000	0.0066	0.0764	0.0861	0.1147
'123'										0.0000	0.0794	0.0905	0.1208
MALI*											0.0000	0.0823	0.0938
EARL*												0.0000	0.1021
MESP*													0.0000

* MALI: *D. mali*, EARL: *D. earlianum*, MESP: *D. mespili*

Die Unterschiede zwischen den Pilzstämmen liegen im Bereich von 0 bis 0,1220. Der maximale Differenzwert innerhalb des Taxon *D. rosae* beträgt 0,0311. Läßt man den Stamm '101' bei der intraspezifischen Betrachtung heraus, so liegt der Differenzwert zwischen 0,0000 und 0,0105. Der Stamm '101' weicht von allen anderen *D. rosae*-Stämmen mit Werten von 0,0284 bis 0,0311 ab.

D. earlianum, *D. mali* und *D. mespili* weisen eine erheblich größere Differenz zu *D. rosae* auf, wobei Werte von 0,0795 bis 0,1208 gefunden werden.

Die Distanzmatrix wurde mit dem Programm neighbor aus dem Phylip-Softwarepaket zu einem Stammbaum umgerechnet (siehe Abbildung 3.18). Als Rechenoperation wurde die neighbor-joining-Methode gewählt.

Die Distanz zwischen den *D. rosae*-Stämme ist gering. Die größte Distanz ist dabei zwischen dem Stamm '101' und den anderen *D. rosae*-Stämmen vorhanden.

Die drei weiteren *Diplocarpon*-Arten bilden eine getrennte Gruppe mit großer Distanz zu den *D. rosae*-Stämmen.

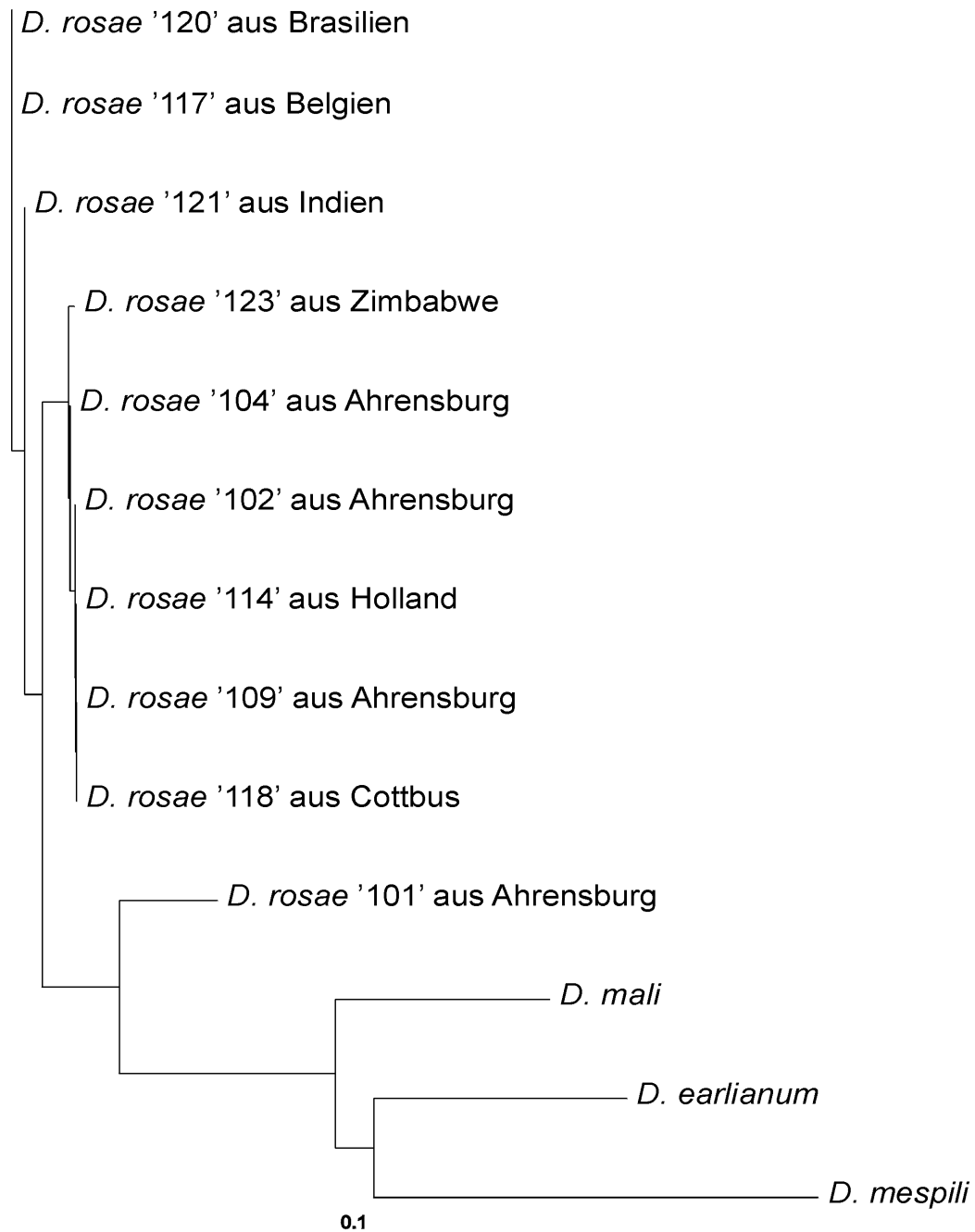


Abbildung 3.18: Intragenerischer Stammbaum der Gattung *Diplocarpon* basierend auf der Distanzmatrix aus Tabelle 3.23.

3.3.6. Einordnung der Gattung *Diplocarpon* in die Ordnung *Helotiales*

Um die Gattung *Diplocarpon* in die natürliche Verwandtschaft einzuordnen, wurde ein Stammbaum nach dem Parsimony-Prinzip erstellt. Dazu wurden Sequenzen verschiedener Pilztaxa aus der Ordnung *Helotiales* von der NCBI-Homepage und der Treebase-Homepage heruntergeladen. Von den 11 in der NCBI-Datenbank angegebenen Familien der Ordnung *Helotiales* konnten 6 in eigenen Untersuchungen einbezogen werden. Von den weiteren 5 Familien sind keine entsprechenden Daten vorhanden.

Mit den heruntergeladenen Sequenzen sowie der Sequenz eines *D. rosae*-Stammes wurde ein Alignment durchgeführt. Da nur begrenzte Sequenzinformationen von einigen Pilz-Taxa in den Datenbanken vorliegen, mussten die Sequenzen auf identische Bereiche beschnitten werden. Es wurde ein 426 bp langer Abschnitt (Angaben bezogen auf *D. rosae* '121') für die weiteren Berechnungen gewählt. Verwendet wurden 110 bp von IST1, den kompletten 5,8s und IST2 und 6 bp von dem 28s-Bereich.

Mit diesen Sequenzabschnitten kann eine Einordnung von *D. rosae* in die Phylogenie der Dermateaceae erfolgen (siehe Abbildung 3.19).

Die nahestehendsten Verwandten von *D. rosae* sind die Arten *Pyrenopeziza brassicae*, *Ramulispora anguioides* und *R. aestiva*. Diese vier Arten werden in die Familie der Dermateaceae eingeordnet. Der Stammbaum enthält eine zweite Gruppe mit Arten aus der Familie der Dermateaceae vor. Diese Gruppe ist deutlich von der Gruppe um *D. rosae* getrennt.

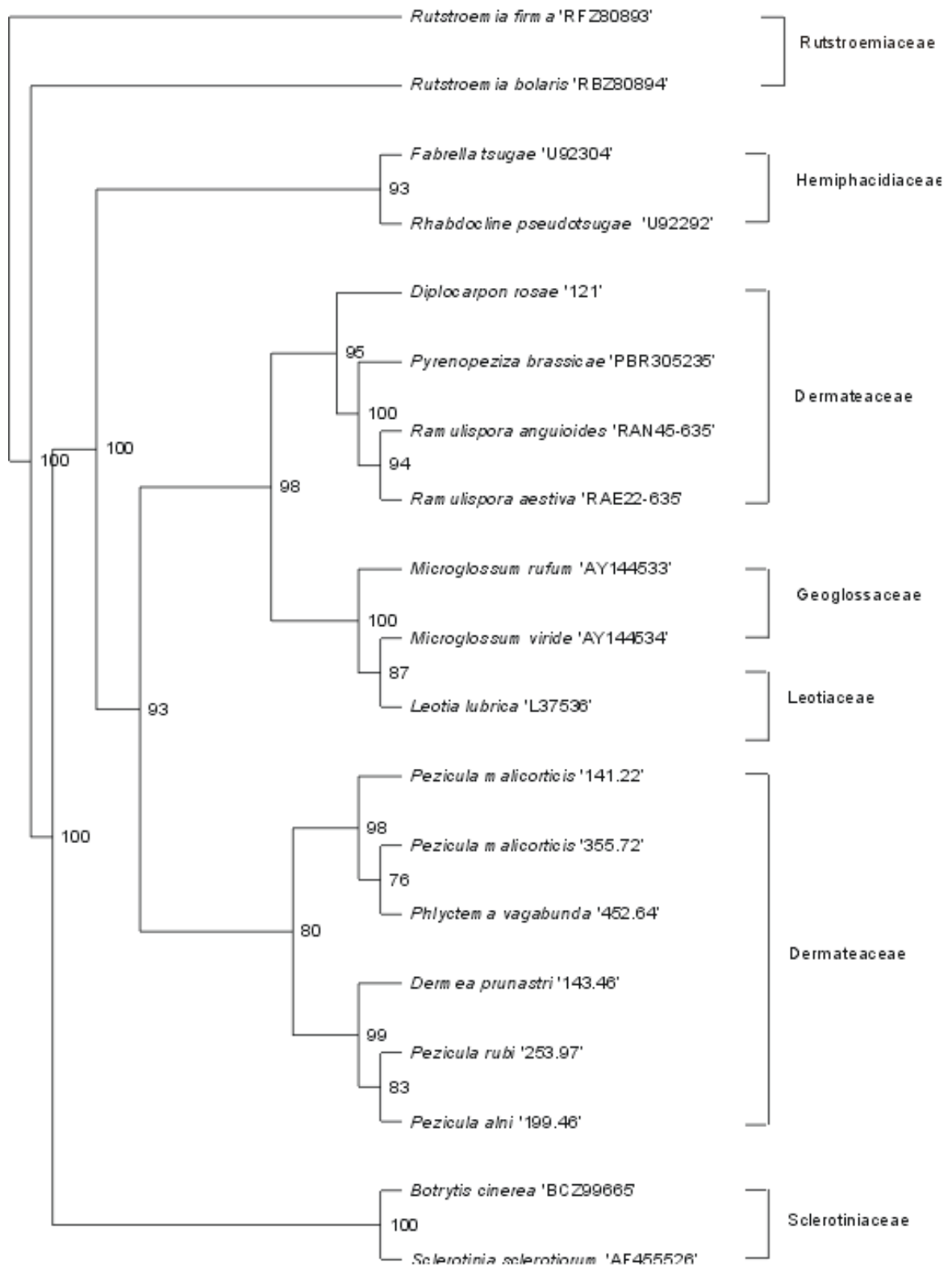


Abbildung 3.19: Phylogenetischer Stammbaum der Ordnung Helotiales beruhend auf rDNA-Sequenzdaten. *Diplocarpon rosae* ist nahe mit den phytopathogenen Pilzen *Pyrenopeziza brassicae* und *Ramulispora* spp. verwandt.

3.3.7. Verwandtschaft von *Diplocarpon* auf der Ebene der Familie der *Dermateaceae*

Nachdem nahe Verwandte von *D. rosae* gefunden wurden und eine Einordnung in der Ordnung Helotiales möglich war, konnte der nähere Verwandtschaftskreis weiter analysiert werden.

Die Datenbanken wurden erneut nach Sequenzen von näher verwandten Arten durchsucht. Die Sequenzen wurden einem Alignment unterzogen und anschließend auf einen einheitlichen Bereich beschnitten. Für die weiteren Berechnungen wurde ein Bereich von 533 bp (bezogen auf den *D. rosae*-Stamm '121') ausgewählt, der 31 bp vom der 18s, die komplette IST1, 5,8S und IST2 und 11 bp vom 28S-Sequenz enthält. Die Sequenz von *Pyrenopeziza brassica*, welche sich im vorhergehenden Stammbaum als nah verwandt zu *D. rosae* herausstellte, konnte aufgrund des gewählten Sequenzabschnittes nicht mit eingefügt werden.

Neben den nah verwandten Taxa aus der Gruppe der *Ramulispora* wurden vier weitere Dermateaceae sowie *Sclerotinia sclerotiorum* als Outgroup in die Analysen einbezogen.

Im Stammbaum (Abb. 3.20) sind vier deutlich voneinander getrennte Gruppen zu erkennen. Die erste Gruppe besteht aus der „Outgroup“ *S. sclerotiorum*. Die zweite durch hohe Bootstrapwerte abgesicherte Gruppe besteht aus Taxa der drei Gattungen *Dermea*, *Pezicula* und *Cryptosporiopsis*.

Die dritte Gruppe besteht aus Taxa der Gattungen *Phialophora*, *Ramulispora*, *Rhynchosporium* und *Diplocarpon*.

Dieser Cluster kann in die Gruppen um *Phialophora*, *Ramulispora* und *Rhynchosporium* und der Gruppe *Diplocarpon* unterteilt werden. Die Trennung der beiden Gruppen wird durch hohe Bootstrapwerte unterstützt.

Innerhalb der Gattung *Diplocarpon* bildet die Art *D. rosae* eine Gruppe, die von den anderen *Diplocarpon*-Arten getrennt ist. Aufgrund von hoher Ähnlichkeit zwischen einzelnen *D. rosae*-Isolaten ergeben sich innerhalb von *D. rosae* teilweise niedrige Bootstrapwerte.

Anschließend wurde mit dem Programm dnadist aus den Phylip-Packet eine Distanzmatrix errechnet. Innerhalb der *Rhynchosporium secalis*-Isolate beträgt die Distanz 0. Die Distanzen zwischen den Arten der Gattung *Ramulispora* liegen im Bereich von 0-0,0319, innerhalb der Gruppe *Ramulispora* und *Rhynchosporium* im Bereich von 0-0,0484.

Die Distanzen innerhalb der Gattung *Diplocarpon* liegen im Bereich von 0-0,1641 und auf der Artebene *D. rosae* von 0-0,0456, bzw. auf der Artebene ohne den Stamm '101' im Bereich von 0-0,0152.

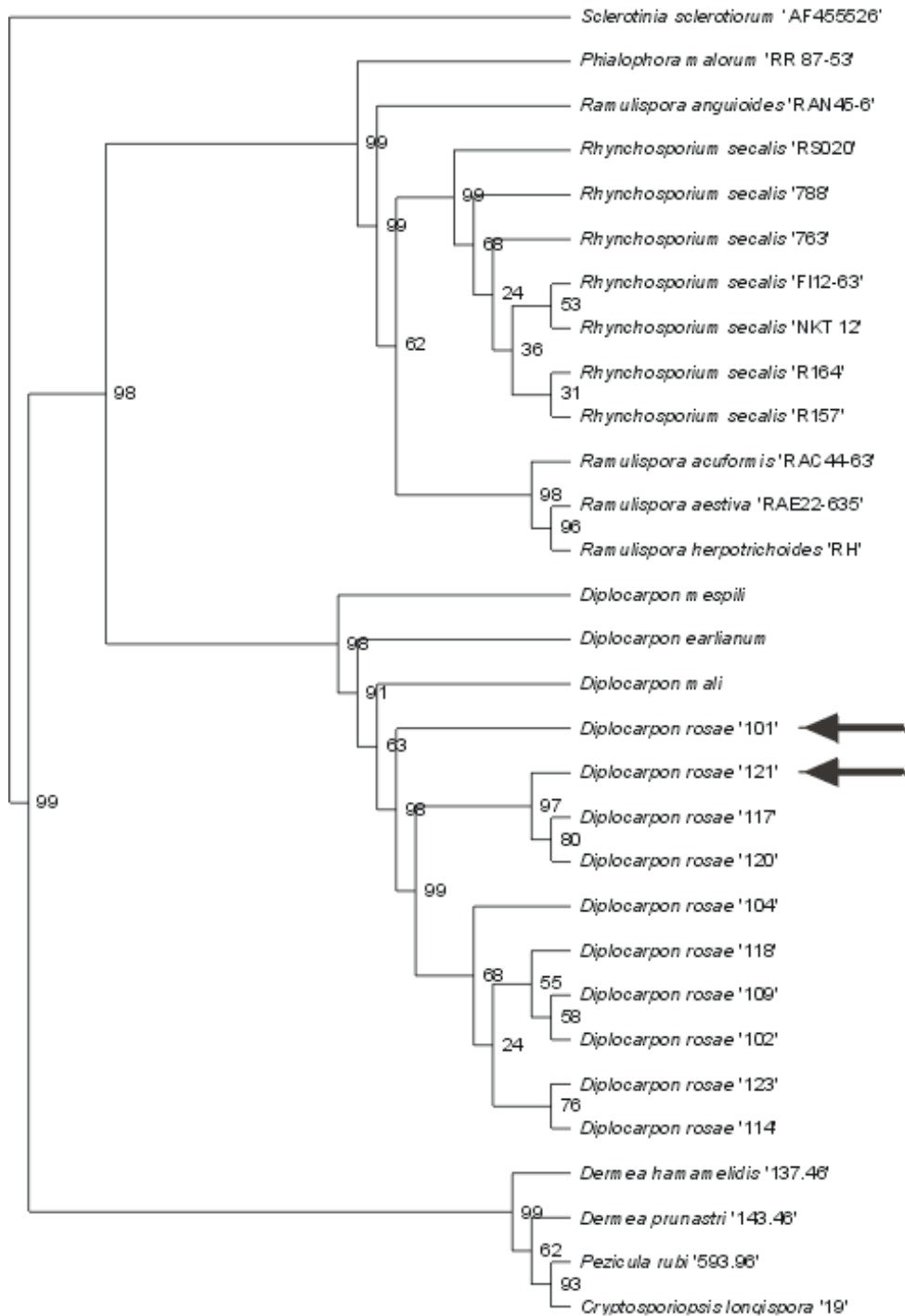


Abbildung 3.20: Phylogenetischer Stammbaum der Familie der Dermateaceae beruhend auf rDNA-Sequenzdaten.

4. Diskussion

4.1. Erschließung neuer Resistenzquellen gegen den Sternrusstaubefall

Der Sternrusstau ist ein an Rosen weit verbreiteter Parasit und richtet in Rosenfreilandkulturen große Schäden an. Traditionell erfolgt die Bekämpfung dieses gefürchteten Parasiten durch Pflanzenschutzmittel (HORST 1989). Auf Grund des sich weiterentwickelnden Umweltbewusstseins und einer verschärften Gesetzgebung im Bereich des Pflanzenschutzes kommt der Entwicklung von resistenten Kulturrosen eine besondere Bedeutung zu.

Da die modernen Kulturrosen nur einen begrenzten genetischen Hintergrund (WYLIE 1954, DEBENER 2000) bei meist niedriger Resistenz gegen den Sternrusstaubefall haben, müssen die Resistenzeigenschaften aus anderen Quellen in die aktuellen Zuchtlinien eingebracht werden.

Eine wichtige Quelle stellen die Wildrosen dar, die sich durch eine hohe intra- sowie auch interspezifische Diversität auszeichnen. Im Bezug auf die Resistenz gegen den Sternrusstaubefall konnte in den eigenen Untersuchungen eine breite Streuung von stark anfällig bis zu absolut resistenten Genotypen festgestellt werden. Damit stellen die Wildrosen eine wichtige Quelle in der Resistenzzüchtung dar (SPETHMANN und FEUERHAHN 2003).

4.1.1. Inokulation und Dokumentation

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion zwischen Rosen und Sternrusstau auf mikroskopischer Ebene untersucht, um die Frage zu klären ob verschiedene Resistenzmechanismen vorliegen, die sich histologisch nachweisen lassen. Die Untersuchungen wurden zum Großteil mit dem Einsporisolat *D. rosae* 'Dort E4' durchgeführt (DEBENER et al. 1998). *D. rosae* 'Dort E4' ist ein aggressiver Stamm und infizierte alle in der Untersuchung von DREWES-ALVAREZ (1992) getesteten Kulturrosen.

Um die Vergleichbarkeit der einzelnen Versuchsansätze zu gewährleisten, wurde bei jedem Inokulationsexperiment eine Kontrollinokulation durchgeführt. Ausgewählt wurde die gegen den Sternrusstaubefall hoch anfällige Teehybride 'Pariser Charme' (DEBENER et al. 1998). Die Interaktion ist mehrfach genau beobachtet und dokumentiert. Bei Inokulationsexperimenten mit Besiedlungsstärken, die von den vorhergehenden

Experimenten abweichen, konnte der Fehler erkannt und ist der Versuch wiederholt worden.

Die Charakterisierung der Resistenzen wurde durch Inokulation an einzelnen Fiederblättchen nach der ‚detached leaf method‘ (WIGGERS et al. 1997) vorgenommen und auf Freilandbonituren wurde verzichtet, da der Befallsdruck vom Sternrusstau auf dem Institutsgelände des IZZ sehr inhomogen ist. Die Rosen stehen großflächig verteilt auf mehreren Testfeldern, so dass die Pflanzen stark unterschiedlichem Mikroklima und unterschiedlichem Befallsdruck ausgesetzt sind. Außerdem wechselt die Stärke des Sternrusstaubefalls von Jahr zu Jahr teilweise dramatisch (DODGE 1931), so dass eine Interpretation von Freilanduntersuchungen eingeschränkt ist.

Es konnte aber beobachtet werden, dass im Freiland befallene Genotypen auch in den Inokulationsexperimenten vom Sternrusstau befallen werden. Andererseits blieben in den Inokulationsexperimenten resistente Rosengentypen, solche mit den Boniturwerten 0-1, auch auf den Testfeldern befallsfrei.

CARLSON-NILSSON (2002) stellte vergleichende Untersuchungen zwischen künstlicher Inokulation und natürlicher Infektion an. Sie stellte fest, dass die Inokulation unter Laborbedingungen eine brauchbare Alternative zu Freilandstudien darstellt. Im Allgemeinen wurden übereinstimmende Tendenzen zwischen den Freilandstudien und den Laboruntersuchungen erzielt, wobei allerdings eine stärkere Infektion unter Laborbedingungen festgestellt wurde als es unter natürlichen Bedingungen der Fall war. Die Abweichungen in den Ergebnissen zwischen den beiden Versuchsteilen waren bei den untersuchten Wildrosen klein, während bei den Kulturrosen die Abweichungen größer waren. Einige Genotypen, die im Feldversuch keine Infektion aufwiesen, zeigten Infektionen unter Laborbedingungen, aber niemals andersherum.

Ein großer Vorteil bei den Untersuchungen mit künstlichen Infektionen ist die Steuerbarkeit von verschiedenen Parametern. Ein wichtiger ist dabei ohne Zweifel das Inokulum (JENKINS 1954). Dieses kann aus definierten Einsporisolen bestehen oder auch aus multiklonalen Gemischen. Soll ein möglichst natürliches Spektrum an Erregern abdeckt werden, so muß das Inokulationsmaterial von infizierten Freilandrosen abgesammelt werden. Möchte man eine möglichst große Reproduzierbarkeit erreichen oder die Versuche zielen auf rassenspezifische Fragestellungen ab, so müssen definierte monoklonale Stämme als Inokulum verwendet werden.

4.1.2. Resistenzmechanismen verschiedener Rosengenotypen gegen den Sternrusstaubeffall

In der Studie über die Resistenzmechanismen von Wildrosen gegen den Sternrusstaubeffall, konnte ein weites Spektrum an Resistenzeigenschaften festgestellt werden. Die Spanne reicht von hoch anfälligen bis zu resistenten Genotypen, wobei unterschiedliche Resistenzmechanismen entdeckt werden konnten.

4.1.2.1. Passive Resistenzmechanismen

Diese greifen an unterschiedlichen Stellen im Lebenszyklus des Erregers ein. Der erste essentielle Schritt im Lebenszyklus des Erregers ist das Anhaften der Konidien an das Blatt. Dieser Vorgang wird von vielen Faktoren beeinflusst, die über den Erfolg der Besiedlung entscheiden können (BRAUN und HOWARD 1994).

Ein wesentlicher Faktor stellt dabei die Oberflächenbeschaffenheit des Blattes und die Stärke der Blattbehaarung dar. In der vorliegenden Untersuchung wurden einige stark behaarte Genotypen einbezogen, wie z.B. *Rosa macrophylla*, *R. mollis*, *R. multiflora*, *R. tomentosa* und *R. villosa*. Diese waren auf Grund der wasserabweisenden Oberfläche nur schwer zu inokulieren. Die Inokulationstropfen perlten leicht von den Blättern wieder ab oder kamen auf den apikalen Spitze der Trichome zu liegen.

Ein Großteil der keimenden Konidien konnte die Distanz zwischen der Haarspitze und der Blattoberfläche nicht überwinden, so dass es zu einer verminderten Infektionsrate kommt. Überwindet man diesen Resistenzmechanismus, in dem der Inokulationstropfen in direkten Kontakt mit der Blattoberfläche gebracht wird, kann es zu einer Infektion kommen. Während *Rosa mollis*, *R. villosa* und *R. tomentosa* sich nach der Überwindung der Behaarung als anfällig erwiesen, liegen bei *R. macrophylla* und *R. multiflora* noch weitere Resistenzmechanismen vor. Wird bei diesen Arten der Inokulationstropfen direkt auf die Blattoberfläche gegeben, so kommt es zu einer primären Infektion. Bei diesen beiden resistenten Genotypen breitet sich die Infektion aber nicht weiter aus.

Die Beobachtung, dass die Blattbehaarung einen wesentlichen Resistenzfaktor darstellt, konnte auch an anderen Pathosystemen festgestellt werden.

KORTEKAMP und ZYPRIAN (1999) untersuchten den Einfluss der Blattbehaarung von verschiedenen *Vitis*-Arten auf den Befall mit *Plasmopara viticola*. Sie kommen zu der Schlussfolgerung, dass bei zwei *Vitis*-Arten, *V. doaniana* und *daavidii*, die Behaarung den wichtigsten Resistenzfaktor gegen den *Plasmopara*-Befall darstellt. In Analogie zu *Rosa multiflora* und *R. macrophylla* konnten bei *Vitis cinerea* und *V. labrusca* neben der

Behaarung noch weitere effektive Resistenzmechanismen festgestellt werden, die die Pflanze nach Überwindung der Behaarung vor einer Ausbreitung des Befalls schützen.

Auch im Pathosystem von *Puccinia recondita* mit Weizen stellt die Behaarung einen effektiven Resistenzmechanismus dar (ROBERTS et al. 1990). Sie konnten keine vollständige Resistenz durch die Blattbehaarung feststellen, vermuten aber, dass durch die Reduktion der Infektionsrate der Ausbruch einer Epidemie verlangsamt werden kann. Auf der Homepage des U.S.-Department of Agriculture geben die Autoren ROBERTS und LONG an, dass der Befall von Weizen mit *P. recondita* durch Sorten mit starker Behaarung um 27% gesenkt werden könne.

Eine starke Behaarung kann nicht nur vor pilzlichen Befall schützen, sondern auch vor Befall mit Schadinsekten wie z.B. Blattläusen (GIBSON 1971). Da Blattläuse als Vektoren für diverse Erreger fungieren, bedeutet eine Erhöhung der Resistenz gegen den Blattlausbefall gleichzeitig eine verbesserte Resistenz gegen andere Erreger, wie z.B. Viren.

Andererseits führt LEVIN (1973) ein Beispiel an, in dem die Zucht auf Resistenz gegen den Befall eines Schädling, die Anfälligkeit gegen einen anderen erhöht. Durch eine hohe Trichomdichte wird Baumwolle vor dem Befall mit der Zikade *Empoasca decipiens* geschützt. Demgegenüber steht eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber dem Befall mit der Weichwanze *Psallus seriatus*. Er folgert, dass eine Selektion auf Resistenz gegen Zikaden eine Erniedrigung der Resistenz gegen den Weichwanzenbefall bedeutet.

Eine weitere Form der passiven Resistenz, die nach der Phase der Anheftung greift, wurde in den eigenen Untersuchungen bei den resistenten Arten *Rosa moyesii*, *R. majalis* und *R. nitida* festgestellt. Ein Großteil der inokulierten Konidien war am Tag der Analyse nicht gekeimt und kollabiert. Dieses deutet auf eine chemische Unterdrückung der Keimung hin, wie es schon von KNIGHT und WHEELER (1978b) bei der *R. hybrida* 'Allgold' beobachtet wurde. Aufgrund der Präparationstechnik war eine Quantifizierung der Keimrate jedoch nicht möglich, so dass die Beobachtung statistisch nicht belegt werden kann.

Eine andere Form der passiven Resistenz wurde bei *Rosa multibracteata* beobachtet. Während bei den vorhergehenden Genotypen die Keimrate unterdrückt war, keimten die Konidien auf *R. multibracteata* zahlreich. Die Keimschläuche drangen aber nicht durch die Kutikula. Da der Pathogen nicht in das Blattinnere vordringt, „verhungert“ dieser auf der Kutikula ohne Schaden an der Rose anzurichten. Um die wirksamen Resistenzmechanismen bei *R. multibracteata* und bei den vorher genannten Arten

R. moyesii, *R. majalis* und *R. nitida* detailliert aufzuklären, wäre eine chemische Analyse der kutikulären Substanzen notwendig.

Von anderen Pilz-Pflanzen-Interaktionen ist aber bekannt, dass die Kutikula einen entscheidenden Einfluss auf den Ausgang der Interaktion haben kann. MARTIN (1964) diskutiert die Bedeutung der Kutikula für die Resistenz und kommt zu dem Schluss, dass die Kutikula sowohl eine physikalische als auch eine chemische Barriere darstellen kann. Die biologisch aktiven Substanzen werden entweder ausgeschieden und lagern sich auf der Kutikula ab oder sie können in der Kutikula eingelagert sein.

Für die Gattung *Malus* wurde ein Resistenzmechanismus nachgewiesen, bei dem pflanzeigene fungitoxische Substanzen der Kutikula den Befall mit Echtem Mehltau reduzieren (MARTIN et al. 1957). Auch in der Gattung *Rosa* wurden fungitoxische Substanzen nachgewiesen sowie diverse biologisch aktive Substanzen aus den Stoffengruppen der Tannine, Flavonoide und Terpene (HASHIDOKO 1996).

4.1.2.2. aktive Resistenzmechanismen

Neben den passiven Resistenzmechanismen wurden auch Hinweise auf aktive Resistenzmechanismen gefunden. Die untersuchten Genotypen von *R. wichuraiana* und *R. roxburghii* erwiesen sich in den eigenen Experimenten als äußerst resistent gegen den Sternrusstaubeffall. Die Konidien hefteten sich an das Blatt, keimten aus und penetrierten einzelne epidermale Zellen. Erst an diesen Punkt der Entwicklung des Parasiten konnten effektive Resistenzmechanismen festgestellt werden. Die befallenen Epidermiszellen reagierten mit Einlagerung von Kallose und deutlicher Papillenbildung. Eine fortschreitende Ausbreitung der Infektion war nicht festzustellen.

Auch REDDY et al. (1992) und WIGGERS et al. (1997) untersuchten die Resistenzeigenschaften von *R. wichuraiana* und *R. roxburghii*. Beim Vergleich der Konidienkeimrate auf den beiden resistenten Rosen mit anfälligen Kulturrosen wurden keine Hinweise auf eine unterdrückte Keimrate gemessen. Die Konidien keimten und bildeten Haustorien sowohl bei den resistenten als auch bei den anfälligen Wirten aus. Bei den anfälligen Genotypen entwickelte sich der Sternrusstau weiter, während bei den beiden resistenten Arten die Entwicklung nach der Penetration der Epidermiszellen stoppte. Es waren keine strukturellen Barrieren vorhanden, die die Resistenz erklären konnten.

Diese Beobachtungen decken sich mit den eigenen Studien. Im Gegensatz zu den vorhergehenden passiven Resistenzmechanismen liegt bei diesen Genotypen ein aktiver Resistenzmechanismus vor. Bei beiden Genotypen, *R. wichuraiana* und *R. roxburghii*,

wurden Kalloseeinlagerung an den befallenen Epidermiszellen, durch die Verwendung des Farbstoffes Anilinblau (HOOD und SHEW 1996), nachgewiesen. Die Haustorien wurden von einer kallosehaltigen Matrix eingekapselt, um das weitere Wachstum zu stoppen und den Nährstofffluss zu dem Erreger zu stoppen.

Außerdem zeigten die Zellwände der befallenen Zellen eine starke Fluoreszenzfärbung, die sich teilweise auch über benachbarte Zellen erstreckte. Der Bereich von fluoreszierenden Zellen war bei den verschiedenen Rosengenotypen unterschiedlich groß. Während bei *R. roxburghii* nur einzelne Zellen fluoreszierten, waren bei anderen Genotypen mehrere Zellen betroffen. Bei *R. wichuraiana* wurde auch in den benachbarten Zellen Kallose eingelagert. Es konnte dabei eine Korrelation zwischen der Anzahl an fluoreszierenden Epidermiszellen und der Größe der makroskopisch sichtbaren Nekrosen festgestellt werden. Bei *R. roxburghii* waren keine Nekrosen makroskopisch sichtbar, bei *R. wichuraiana* kleine punktförmige und bei *R. caudata*, ebenfalls ein resistenter Genotyp, große flächige nekrotische Bereiche.

Aufgrund der beobachteten Reaktionen, wie z.B die Bildung von Nekrosen am Ort der Infektion, liegt die Vermutung nahe, dass bei diesen drei Genotypen eine Hypersensitive Reaktion (HR) abläuft, die durch einzelne Resistenzgene (R-Gene) gesteuert wird.

Bei der HR-Reaktion handelt es sich um einen selbstinduzierten Zelltod und wird als rasches und lokales Absterben von Pflanzenzellen in Zusammenhang mit der Resistenz gegen Pathogenbefall definiert (DICKMAN et al. 2001).

Ein charakteristisches Kennzeichen für die HR ist eine systematische Degradierung der DNA und die Bildung von „apoptotic bodies“ (ASAI et al. 2000). Eine Nachweis der Apoptose kann über die degradierte DNA erfolgen, in dem die DNA mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt wird oder auch in situ über Reagenzien, die an das 3'-Ende der Nukleotidketten binden (WANG et al. 1996).

Gesteuert wird die HR durch Resistenzgene. R-Gene gehören zu einer großen und diversen Gruppe von Sequenzen im Pflanzengenom. Die meisten dieser Gene gehören der Genfamilie an, die für Nukleotide bindende Proteine (NBS) und eine leucinreiche Region (LRR) codieren (PAN et al. 2000). Diese NBS-LRR Gene sind im Pflanzenreich weit verbreitet. In *Arabidopsis* gibt es wenigstens 200 verschiedene NBS-LRR-Gene, die bis zu 1% des Genoms ausmachen (ELLIS et al. 2000). Die meisten NBS-LRR-Gene und andere R-Gene befinden sich in Ketten, die Millionen von Basenpaaren umfassen und aus dutzenden R-Gen-Sequenzen bestehen (YOUNG 2000).

Während eine hohe Diversität in der Sequenz der R-Gene vorkommt und diese unterschiedliche Resistenzantworten hervorrufen können, teilen die R-Gene eine Gemeinsamkeit. Die Funktion der R-Gene wird vom Genotyp des Pathogens beeinflusst (BENT 1996).

Das erste in der Gattung *Rosa* entdeckte Resistenzgen, *Rdr1*, führt zu einer vollständigen Resistenz gegen den Befall von Sternrusstau der Rassen 1-5 und somit auch gegen *D. rosae* 'Dort E4' (MALEK et DEBENER 1998). Mittlerweile sind drei Resistenzgene bei Rosen bekannt und konnten bereits mittels AFLP, RAPD und SCAR auf einer Chromosomenkarte lokalisiert werden. Zwei der Gene, *Rdr1* und 2, bewirken eine Resistenz gegen den Sternrusstaubefall, während das dritte Gen, *Rpp1*, gegen Befall mit dem Echten Mehltau wirkt (HATTENDORF et al. 2004).

Das Gen *Rdr1* wird monogen, dominant vererbt und stammt aus dem Genotyp 91/100-5, eine tetraploide Multiflora-Hybride. Monogen ererbte Resistenzen, nach dem Flor-Modell, können durch neu auftretende Erregerrassen gebrochen werden. 1998 trat erstmalig auf dem Gelände des IZZ eine Sternrusstaurasse auf, der mit dem bis dahin befallsfreien Genotyp 91/100-5 eine kompatible Interaktion eingeht (MALEK-PODJASKI 1999). Auf Grund des besonderen Wirtsspektrums wurde diese Erregerrasse in den molekularbiologischen Abschnitt näher untersucht und charakterisiert. Von dem neuen Erregerstamm wurde das Einsporisolat '101' angelegt und mittels Mikrosatellitenmarkern, AFLP und der rDNA charakterisiert.

4.1.3. Resistenzen gegen verschiedene Erregerstämme

Bei der Züchtung von Rosen werden resistente Rosen angestrebt, die ohne Einsatz von Pflanzenschutzmitteln gedeihen. Eine wichtige Information für die gezielte Einkreuzung von Resistenzen ist die Anzahl der beteiligten Gene. Monogen vererbte Resistenzen können leicht in Zuchtlinie eingekreuzt werden, während polygene Resistenzen schwieriger zu handhaben sind und wesentlich größere Populationen in den einzelnen Zuchtschritten benötigen. Nachteilig bei der Verwendung von monogenen Resistenzen ist die hohe Wahrscheinlichkeit, dass diese durch neue Erregerstämme überwunden werden (MALEK et DEBENER 1998).

MALEK-PODJASKI (1999) stellte beim Screening von 130 Rosengenotypen den starken Einfluß des Erregers auf den Ausgang der Interaktion fest. In der ersten Screeningrunde wurde das Einsporisolat 'Dort E4' eingesetzt. Dabei wurden 89 als anfällig eingestuft und 41 Genotypen als resistent gegen diesen Erregerstamm. In der zweiten Screeningrunde

wurde ein anderes Inokulum, eine Mischung gesammelt vom IZZ-Gelände, verwendet. Von den 41 gegen 'Dort E4' resistenten Genotypen waren nur 17 auch gegen das neue Inokulum resistent. Nach einer weiteren Runde mit einer anderen Quelle für das Inokulum wurden nur noch 15 Genotypen als resistent eingestuft. Anschließend wurden diese Genotypen auf Resistenz gegen den Erregerstamm von der Rose 91/100-5 getestet und 5 der 15 Genotypen wurden befallen.

In den eigenen Studien wurden die Interaktion dieser 10 Genotypen mit 'Dort E4' mikroskopisch untersucht und die Resistenzen konnten, bis auf bei *R. corymbifera* 'Laxa', bestätigt werden. Neben diesen waren noch weitere 11 Genotypen, die auch von MALEK-PODJASKI (1999) getestet worden sind, resistent gegen 'Dort E4'. Durch welches Inokulum diese bei MALEK-PODJASKI (1999) befallen wurden und aus dem Screening herausfielen, lässt sich nicht nachvollziehen. Ein Großteil dieser Genotypen weist im eigenen Screening auch Resistenzen gegen andere Erregerstämme auf und können als Resistenzquellen genutzt werden. Sie können zwar keine Resistenz gegen alle Erregerstämme vermitteln, aber durch „Pyramidisierung“ ist es möglich, mehrere Eigenschaften zu kombinieren, um so vollständige Resistenzen zu erreichen.

In der vorliegenden Arbeit wurden außerdem weitere 19 resistente Genotypen gefunden, die nicht von MALEK-PODJASKI (1999) untersucht worden sind. Beim Test mit anderen Erregerstämmen konnten diese Resistenzen, bis auf bei 3 Ausnahmen, bestätigt werden, so dass auch diese Genotypen wertvolle Ressourcen darstellen.

4.2. Diversitäts- und Phylogenetische Analysen mittels Mikrosatelliten- und AFLP-Markern, sowie Sequenzen von rDNA-Bereichen

Die bisherige Strategie in der Rosenzucht basiert im wesentlichen auf der Herstellung von vielen Kreuzungsnachkommenschaften. Anschließend werden diese Hybriden auf bestimmte Merkmalskombinationen selektiert. Pflanzen mit positiven Eigenschaften, wie z.B. Blütenfüllung, werden herausgesucht und anschließend in mehrjährigen Tests auf Anfälligkeit gegen Schädlingsbefall im Freiland geprüft. Da auf den Testfeldern nur ein bestimmtes Spektrum an Erregern vorkommt, kann sich eine Rose auf einem Testfeld als resistent, aber an anderen Standorten mit abweichenden Erregerstämmen sich als anfällig erweisen. Um die Resistenzzüchtung zu optimieren, sind weitere Kenntnisse über die Diversität und Ausbreitungsgeschwindigkeit des Erregers sowie über dessen Rassenstruktur insbesondere auf den Testfeldern notwendig.

Im ersten Schritt sollte der Sternrusstau in reproduzierbare Gruppen unterteilt werden. Eine praktikable und gut reproduzierbare Lösung ist Kategorisierung basierend auf DNA-Markertechniken. Da die verschiedenen Markertechniken unterschiedliche Vor- und Nachteile haben, die sich teilweise durch die Kombination der Methoden eliminieren lassen, wurden in der vorliegenden Studie *D. rosae* mit drei Techniken untersucht, mit Mikrosatelliten- und AFLP-Markern sowie mit der Analyse der rDNA. Die Analyse mit Mikrosatelliten war am aufwendigsten, da vor der Analyse die Entwicklung der Mikrosatellitenprimer sowie die Entwicklung einer Untersuchungsmethode für Freilandmaterial stand.

4.2.1. Mikrosatelliten

Für die Entwicklung der Mikrosatellitenmarker wurde DNA vom Einsporisolat *Diplocarpon rosae* '101', isoliert von der Kulturrose '91/100-5', verwendet. Nach dem Verdau der DNA wurde eine genomische DNA-Bank angelegt und diese nach Klonen mit Mikrosatelliten durchsucht. Anschließend wurden diese Klone sequenziert und Primer für Mikrosatellitenanalysen hergestellt. Mit den Primern konnten populationsgenetische Studien durchgeführt werden. Ferner wurden zwei Methoden entwickelt, mit dem Freilandmaterial von *D. rosae* ohne vorhergehende Kultivierung untersucht werden kann.

4.2.1.1. Aufbau der genomischen DNA-Bank

Für die Herstellung der primären Bank wurde die genomische DNA mittels *Eco R1* geschnitten. *Eco R1* hat die Erkennungssequenz G'AATT_C und schneidet statistisch alle $4^6=4096$ Basenpaare einmal.

Für die genomische Bank wurden Fragmente mit einer Größe von 500-1500 bp kloniert. Die verwendete Fragmentgröße liegt etwa 25% unterhalb der statistischen Fragmentgröße aus dem Restriktionsverdau. Das bedeutet, dass nur ein Teil, etwa 20%, des Sternrusstaugenomes in die DNA-Bank eingebaut und nach Mikrosatellitenmotiven durchsucht wurde.

Durch die Verwendung von häufiger schneidenden Restriktionsenzymen, Kombination verschiedener Restriktionsenzyme oder auch durch Partialverdau kann das Genom vollständiger in eine DNA-Bank eingebaut werden. BUCHELI et al. (1998) verwendeten *RsaI* und *HaeIII*, beides Restriktionsenzyme mit 4 Basen Erkennungssequenz, um eine genomische Bank von *Microbotryum violaceum* aufzubauen. TENZER et. al (1999)

verdauten die DNA von *Venturia inaequalis* mit dem Enzym *Tsp509I* mit der Erkennungssequenz 'AATT_' für den Restriktionsverdau.

PANIEGO et al. (2002) konstruierten eine Phagenbank aus nur etwa 4% des Genoms von *Helianthus annuus* L.. Beim Screening nach Mikrosatelliten zeigten 1856 von ca. 500.000 Klonen positive Signale (siehe Tabelle 4.3), was etwa 0,37% entspricht. In der zweiten Hybridisierungsrunde wurden bei ca. 65% der Klone die Ergebnisse aus der ersten Runde bestätigt. Nach der Sequenzierung der Klone erhielt PANIEGO et al. (2002) 608 brauchbare Sequenzen mit Mikrosatellitenmotiven, was einen weiteren Ausschuss von etwa 50% entspricht.

In der vorliegenden Arbeit wurde in der zweiten Hybridisierungsrunde bei ca. 57% der Klone das Ergebnis der ersten Hybridisierungsrunde bestätigt. Nach dem Schritt der Sequenzierung wurde bei 25 unterschiedlichen Klonen Mikrosatelliten gefunden, was etwa 28% der untersuchten Klone entspricht. Einige Klone enthielten mehrere Mikrosatelliten und so konnten insgesamt 33 Primerpaare entwickelt werden.

Tabelle 4.3. Vergleich der Selektierungsschritte von PANIEGO et al. (2002) mit der eigenen Studie

	PANIEGO et al.	eigene Studie
untersuchte Klone	500.000	150.000
positive Signale nach der ersten Hybridisierung	1.856	155
positive Signale nach der zweiten Hybridisierung	1.206	88
Klone mit Mikrosatelliten nach Sequenzierung	608	25
Primer konstruiert	271	33
Primer mit spezifischen PCR-Produkten	216	21
polymorphe Primer	170	9

Zur Optimierung der ersten Selektionsschritte kann zwischen dem Restriktionsverdau und der Klonierung ein Anreicherungsschritt eingefügt werden. BRONDANI et al. (2000) verdauten genomische DNA von *Magnaporthe grisea* mit *Tsp509I*, selektierten Fragmente von der Größe 300-600 bp und reicherten Fragmente mit Mikrosatelliten an. Dazu wurden die Fragmente gegen biotinylierte Oligonukleotide mit den Motiven AG/CT hybridisiert und selektiert. Nach diesem Anreicherungsschritt erfolgte die Klonierung in Lambda Zap. Die Anreicherung war erfolgreich und in der nachfolgenden Hybridisierung zeigten etwa 40% der Klone positive Signale. Ohne den Schritt der Anreicherung wurden in der vorliegenden Arbeit bei 150.000 Klonen nur 155 Klone mit positiven Signalen gefunden, was in etwa 0,1% entspricht. Nachteilig an der Anreicherungsstrategie ist, dass für jedes unterschiedliche Mikrosatellitenmotiv eine eigene angereicherte Bank hergestellt werden

muss. Bei der Strategie ohne vorhergehende Anreicherung kann die genomische Bank auf verschiedene Mikrosatellitenmotive hin untersucht werden.

4.2.1.2. Verbreitung und Häufigkeit von Mikrosatelliten im Genom

In den Untersuchungen wurden 84 Klone mit Mikrosatelliten entdeckt und sequenziert. Einige Klone weisen eine identisch Sequenzabfolge zu anderen Klonen auf, so dass 54 unterschiedliche Mikrosatelliten ausgemacht werden konnten.

Klone mit identischen Sequenzen wurden in der Auswertung so gehandhabt, als ob diese auf einen Sequenzabschnitt zurück zuführen sind und entweder mehrfach kloniert oder durch die Vermehrung der Phagenbank entstanden sind.

Die Klone mit den Mikrosatelliten AAT weisen eine hohe Identität zueinander auf, allerdings mit kleineren Sequenzunterschieden, so dass diese auf mehrere Sequenzabschnitte mit Sternrusstaugenom verteilt sein müssen. Damit wurde festgestellt, dass diese Mikrosatelliten tragenden Abschnitte selber repetitive sind und mindestens in 25 leicht variablen Kopien im Genom vorkommen. Da nur ein Teil des Genoms untersucht wurde, liegt die reale Anzahl an Kopien wahrscheinlich höher. Etwa 20% des Genoms wurde untersucht, so dass die Gesamtzahl der Mikrosatelliten im Genom vom Sternrusstau etwa 5 fach größer sein sollte.

Tabelle 4.4: Hochrechnung der unterschiedlichen Mikrosatelliten vom Sternrusstau sortiert nach den Motiven. Aufgeführt sind nur die Mono-, Di-, und Trinukleotidmotive.

Motiv	A	AG	GT	AAT	AAG	GAT	CAA	CTG	TGG
Anzahl	10	45	5	5 (125)	40	10	5	5	5

Die Frequenz mit der Mikrosatelliten im Genom vorkommen ist von Organismus zu Organismus unterschiedlich. MOON et al. (1999) untersuchte die Frequenz von Mikrosatelliten im endophytischen Pilz *Epicloë*. Die Frequenz für die Mikrosatellitenmotive CA und GA lag bei 1 pro 2 Mbp und damit in der Größenordnung wie beim Sternrusstau. Vergleicht man die Werte mit den für Weizen (1 pro 0,27 Mbp) und den für Tomaten (1 pro 1,2 Mbp) so ist die Frequenz für Mikrosatelliten beim Sternrusstau relativ niedrig. Allgemein ist bei Organismen mit kleinem Genom die Mikrosatellitenfrequenz niedriger als bei Organismen mit großem Genom.

4.2.1.3. Primertestung

33 Primerpaare wurden für die Markeranalyse entwickelt und getestet. 14 (42%) dieser Primerpaare amplifizierten klare Banden mit der erwarteten Basenpaarlänge bei unterschiedlichen *D. rosae*-Stämmen und 9 (27%) dieser Primerpaare zeigten Polymorphismen. Die Daten liegen im Bereich wie es auch von anderen pathogenen Pilzen bekannt ist.

BRONDANI et al. (2000) entwickelte 24 Mikrosatellitenprimer für den reispathogenen Pilz *Magnaporthe grisea*. 21 der Primerpaare amplifizierten keine Banden bzw. kein eindeutiges Bandenmuster. Nur mit dreien dieser Primerpaare wurden klare DNA-Banden amplifiziert.

BURGESS et al. (2001) entwickelten Mikrosatellitenmarker für *Sphaeropsis sapinea*, ein endophytischer Pilz an *Pinus*-Arten. 22 Primerpaare wurden entwickelt und mit 15 dieser Primerpaare wurden polymorphe Produkte amplifiziert. Die Autoren führen die hohe Erfolgsrate auf die optimierte Screeningsmethode zurück. Sie verwendeten keine genomische Bank für das Auffinden von Mikrosatelliten, sondern erfassten mikrosatellitenreiche Sequenzabschnitte durch PCR-Reaktionen. Dazu wurden Primer mit Mikrosatellitensequenzen verwendet, die am 5' Ende einen degenerierten Abschnitt aufwiesen.

4.2.1.4. Konidienaufschlußmethoden

Für die Markeranalyse mit Mikrosatellitenprimer muß geeignete DNA in der PCR-Reaktion eingesetzt werden. In der Regel wird eine größere Menge an Zellen aufgeschlossen und in aufwändigen Verfahren extrahiert. Für Untersuchungen von Pathogenpopulationen werden meist Einsporkulturen angelegt und nach einer Kultivierungsphase DNA isoliert. Gängige Methoden um aus Pilzmaterial DNA zu isolieren ist die CTAB- (CUBERO 1999) und die SDS- (LEE und TAYLOR 1990) Methode. CUBERO et al. (1999) schlossen das Pilzmaterial mechanisch in flüssigem Stickstoff auf. Anschließend folgten diverse Extraktionsschritte und längere Inkubationszeiten. Die Methode ist geeignet um größere Probenmengen bei kleiner Probenzahl durchzuführen. Für Reihenuntersuchungen mit großer Probenzahl bei kleinen Probenmengen ist die Methode ineffektiv. Deswegen wurde erstmalig eine Methode angewendet, die es erlaubt ohne vorhergehende Kultivierung des Pathogens und ohne aufwendigen DNA-Isolierungsschritte die Untersuchungen durchzuführen.

Als Ausgangsmaterial für die PCR-Reaktion dienten Konidien, die direkt von befallenem Blattmaterial abgesammelt werden können. Allerdings sind die Konidien von *D. rosae* sehr widerstandsfähig und im Mörser kaum aufzuschließen. Andere Methoden wie Verlängerung der Initialphase der PCR bei 94°C (AUFAUVRE-BROWN et al. 1993), Mikrowellenbehandlung (FERREIRA et al. 1996) oder Einfrieren in flüssigen Stickstoff (XU und HAMER 1995) eignen sich für die Untersuchung verschiedener Pilze. Aufgrund der Sporenbeschaffenheit von *D. rosae* eignen sich diese Methoden jedoch nicht. Die Aufschlussrate der Konidien war sehr gering und die PCR-Reaktion schlug häufig fehl.

Um den Effekt der niedrigen Konidienaufschlussrate auszugleichen kann die Sporenanzahl pro PCR-Reaktion erhöht werden. Allerdings inhibiert eine zu hohe Konzentration die PCR-Reaktion. XU und HAMER (1995) führten Sporen-PCR mit *Magnaporthe grisea* durch. Sie ermittelten eine ideale Sporenkonzentration von 10^4 bis 10^6 pro PCR-Reaktion. Ab einer Höhe von 10^6 trat eine Inhibierung der PCR-Reaktion ein. LEE und TAYLOR (1990) konnten PCR-Reaktionen mit einer einzelnen Spore durchführen. Dazu wurden zwei Glas-Objektträger mit Silikon beschichtet. Einzelne Askosporen von *Neurospora crassa* wurden zwischen den beiden Objektträgern zerdrückt und anschließend in die PCR-Reaktion geschwemmt. PCR-Reaktionen mit einzelnen Sporen ergaben nur eine schwache Bande, während bei einer Sporenkonzentration von 10 pro PCR-Reaktion die Bande deutlich ausgeprägt war.

Die Versuchsbedingungen lassen sich allerdings nicht direkt auf die eigenen Untersuchungen übertragen. Erstens ist die Anatomie der Meiosporen von *Neurospora crassa* für einen Zellaufschluss besser geeignet, zweitens wurde ein Bereich der rDNA amplifiziert und drittens wurden 70 PCR-Zyklen durchgeführt.

Die Methode des Konidienaufschlusses mittels zweier Objektträger wurde an die eigenen Versuchsbedingungen adaptiert. Mit einer Sporenkonzentration von 2.000 bis 10.000 pro 10 µl des PCR-Ansatzes wurden Produkte der erwarteten Länge amplifiziert.

Nachteilig an der Methode ist, dass für jede PCR ein erneuter Zellaufschluss durchzuführen ist. Sollen mehrere PCR-Reaktionen mit derselben Konidiensammlung durchgeführt werden, so empfiehlt sich die Ultraschall-Methode. Dabei werden die Konidien in DNA-stabilisierenden Puffer mit Ultraschall aufgeschlossen. Anschließend folgt eine DNA Aufreinigung. Der Zeitaufwand und die Kosten sind dadurch höher. Der höhere Zeitaufwand durch die DNA-Präparation wird aber dadurch wettgemacht, dass die Lösung für mehrere PCR-Reaktionen genutzt werden kann.

4.2.1.5. Populationsstudien

Von den 33 entwickelten Primerpaaren wurden die 8, die die stabilsten und informativsten Ergebnisse ergaben, ausgewählt und für Populationsstudien verwendet. 85 Sternrusstau-Proben verschiedenster Herkünfte wurden auf Polymorphismen untersucht. Mit diesen Mikrosatellitenmarkern ließen sich 8 Gruppen unterscheiden. Die größte Gruppe, die sich mittels der Mikrosatellitenmarker nicht weiter unterteilen lässt, besteht aus 62 Proben. Die Herkünfte der Proben ist sehr divers. Mitglieder dieser Gruppe wurden in Europa (z.B. Deutschland, Belgien und England), Asien (z.B. Japan und Indien), Australien und Südamerika (Brasilien) gesammelt.

Auf den Versuchsflächen in Sparrieshoop und in Uetersen wurde ausschließlich Sternrusstau dieser Gruppe gefunden. Auf den Versuchsfeldern in Ahrensburg sind sowohl diese als auch weitere Gruppen vertreten.

Proben der anderen 7 Gruppen stammen zum Großteil aus den Ahrensburger Versuchsflächen, sowie je eine Probe aus Baden-Baden, Holland und Australien.

Die anderen 20 Proben aus den Gruppen 2-7 stammen von den IZZ-Versuchsflächen in Ahrensburg.

Damit wurde auf den Versuchsflächen des IZZ eine höhere Diversität gemessen als auf den beiden Testfeldern der Rosenzuchtbetriebe. Ein Grund für die höhere Diversität des Sternrusstau mag an der höheren Diversität der Rosengentypen auf dem IZZ-Gelände liegen, sowie in dem Alter der Anpflanzung. Während am IZZ die meisten Rosen im Jahr 1993 angepflanzt wurden, stehen die Testfelder der Rosenzuchtbetriebe nur 3 Jahre und werden anschließend anderen Orts wieder eingerichtet. Damit unterliegt der Sternrusstau dort einem starken Selektionsdruck in Richtung auf eine schnelle Ausbreitung und eine Adaption an den Wirtsgenotyp wird eingeschränkt.

4.2.1.6. Anwendung der Mikrosatellitenmarker

In den Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Mikrosatellitenmarker geeignete Marker für die Unterscheidung von Sternrusstautämmen darstellen. Der Sternrusstau hat eine ausreichende Anzahl an Mikrosatelliten im Genom von denen in den Untersuchungen nur ein kleiner Teil gefunden und verwendet wurde.

Das Anwendungsgebiet ist relativ weit, so konnten Untersuchungen mit axenischen Kulturen sowie mit Freilandproben ohne vorhergehende Kultivierung durchgeführt werden.

Außerdem konnte die hohe Reproduzierbarkeit von Mikrosatellitenmarkern bestätigt werden.

Ein Manko an dieser Markertechnik ist der hohe Aufwand bei der Entwicklung der Marker. Ebenfalls als nachteilig hat sich die eingeschränkte Übertragbarkeit der Primer herausgestellt. Mikrosatellitenprimer haben eine hohe Spezifität, so dass diese häufig nur innerhalb einer Art Amplifikate erzeugen können.

Als ebenfalls nachteilig hat sich herausgestellt, dass nur ein geringer Polymorphiegrad festgestellt werden konnte. Da in weiteren Untersuchungen mit anderen Markern ein höherer Polymorphiegrad gemessen wurde, beruht die geringe Auflösung nicht auf einer geringen Diversität des Sternrusstaus.

Vermutlich ist die hohe Spezifität der Primer in Kombination mit der Auswahl des Genotypes, welcher für den Aufbau der DNA-Bank verwendet wurde, dafür verantwortlich. Die genomische Bank wurde mit den *D. rosae*- Stamm '101' aufgebaut, der sich verwandtschaftlich deutlich von den anderen Sternrusstautämmen abgrenzt. Dadurch ist die Übertragbarkeit der Primerpaare auf andere Stämme eingegrenzt. An sehr polymorphen DNA-Abschnitten mit Mikrosatelliten können die entwickelten Primer bei vielen Stämmen nicht binden. An konservativen DNA-Abschnitten können die Primer zwar binden, aber die Wahrscheinlichkeit eines Längenpolymorphismus zwischen zwei Stämmen ist durch den konservativen Charakter der Sequenz geringer.

4.2.2. AFLP

Während bei den Mikrosatellitenmarkern die hohe Spezifität einer der hervorragenden Eigenschaften ist und PCR-Reaktion mit nur sehr geringer DNA-Menge durchgeführt werden kann, ist einer der wesentlichen Vorteile der AFLP-Analyse die universelle Einsetzbarkeit der Methode. AFLP-Analysen können mit DNA von jedem Organismus durchgeführt werden. Die Methode muss nicht oder nur sehr geringfügig auf den zu testenden Organismus abgestimmt werden.

Nachteilig an der AFLP-Methode ist, dass sehr hochwertige DNA eingesetzt werden muß. Auch sind Kontaminationen bei der AFLP-Reaktion zu vermeiden, so dass keine Freilandproben untersucht werden können. Für die AFLP-Reaktion muss der Erreger erst axenisch kultiviert werden, um an kontaminationsfreie DNA zu gelangen.

4.2.2.1. Diversität von *D. rosae* gemessen mit AFLP

Mit der AFLP-Analyse konnten Polymorphismen innerhalb der Gattung *Diplocarpon* sowie auch innerhalb der Art *Diplocarpon rosae* festgestellt werden. Alle 10 untersuchten Pilzstämmen lassen sich eindeutig voneinander trennen. In den Untersuchungen hat sich die AFLP-Technik als reproduzierbare und hoch informative Methode für die Untersuchung von Sternrusstaustämmen herausgestellt.

Die Ähnlichkeit zwischen den *D. rosae*-Stämmen beträgt, mit wenigen Ausnahmen, ca. 70-80%, was einem Polymorphiegrad von 20-30% entspricht.

Damit liegt der Polymorphiegrad in dem Bereich, der auch von anderen Askomyzeten bekannt ist. BOCK et al. (2002) untersuchte die genetische Variation innerhalb der Art *Alternaria brassicola* mit der AFLP-Technik. Innerhalb des Taxons *A. brassicola* waren 20,4% der AFLP-Marker polymorph. Zusätzlich verglichen die Autoren den Polymorphiegrad von *Alternaria brassicola* zu *Alternaria alternata* und *Rhynchosporium secalis*. Zwischen den drei Arten waren zwischen 97,9-99,3% der Marker polymorph. Damit sind die Polymorphiegrade zwischen diesen drei Arten etwas höher im Vergleich zu den Polymorphiegraden zwischen den *Diplocarpon*-Arten, bei denen die Werte zwischen 87 und 92% liegen.

Ebenfalls eine hohe Variabilität zwischen verschiedenen Isolaten wurde bei dem phytopathogenen Pilz *Pyrenopeziza brassicae* gefunden. Dieser, wie *D. rosae* zu der Familie der Dermataceae gehörige Pilz, wurde von MAJER et al. (1996) mit der AFLP-Methode analysiert. Hierbei wurden von 0 bis 24 Polymorphismen zwischen den Stämmen sichtbar. Durchschnittlich wurden pro Primerkombination zwischen zwei Stämmen 4,1 Polymorphismen entdeckt. Insgesamt konnten 162 polymorphe Fragmente in den 21 Primerkombinationen festgestellt werden.

MENG und CHEN (2001) wendeten die AFLP am phytopathogenen Pilz *Phialophora gregata* an. Sie benutzten 8 verschiedene AFLP-Primerkombinationen. Drei der Primerpaare ergaben keine polymorphen Banden, während 5 Primerpaare 55 Fragmente amplifizierten, von denen 20 sich als polymorph erwiesen.

Für die Gattung *Diplocarpon* wurden ca. 12,5 auswertbare Banden pro AFLP-Reaktion und Genotyp festgestellt. Damit liegt die Anzahl der Banden pro AFLP-Reaktion in ähnlichen Bereichen wie bei *P. gregata*, was auf eine ähnliche Genomgröße von *P. gregata* und Arten aus der Gattung *Diplocarpon* schließen lässt.

Desweiteren verglichen MENG und CHEN (2001) die AFLP-Methode mit der ISSR-Methode. Von 90 verwendeten ISSR Primerpaare lieferten nur 13 auswertbare Fragmente. Diese

amplifizierten 66 Fragmente von denen 45 polymorph waren. Der Polymorphiegrad beträgt bei der ISSR („inter simple sequence repeat“) -Methode 68,2% und bei der AFLP-Methode 36,4%. Damit ist die ISSR-Methode in diesen Fall höher auflösend als die AFLP-Methode. Die ISSR-Methode hat noch weitere Vorteile gegenüber der AFLP-Technik. Für die Analyse wird eine geringere Menge an DNA benötigt und ein Verdau der DNA und die anschließende Ligation eines AFLP-Adapters ist nicht notwendig. Besonders der Restriktionsverdau der DNA verursacht immer wieder Probleme bei der AFLP-Analyse. Nachteilig an der ISSR-Methode gegenüber der AFLP-Methode ist, dass viele Primerkombinationen getestet werden mussten, um informative Kombinationen zu finden. Die Autoren konnten zeigen, dass die ISSR-Methode bei *P. gregata* eine sinnvolle Ergänzung oder auch Ersatz für die AFLP-Methode darstellt.

An Arten der Gattung *Diplocarpon* wurde diese Technik noch nicht durchgeführt, so dass keine Vergleichsdaten vorliegen.

KOTHERA et al. (2003) untersuchten eine weltweite Sammlung von *Didymella bryoniae* mit AFLP-Markern und verglich diese mit der RAPD-Methode. Sie untersuchten 102 Isolate mit 7 AFLP-Primerkombinationen. 450 Positionen mit Fragmenten wurden detektiert, von denen 134 (30%) polymorph sind. Im Durchschnitt waren 19 Fragmente pro Primerpaar polymorph. Mit dieser Untersuchung wurde eine höhere genetische Variation festgestellt, als auf der RAPD basierenden Untersuchung.

RAPD-Untersuchungen an *D. rosae* wurden von SCHULT (1994) durchgeführt. Sie konnte genetische Unterschiede zwischen verschiedenen Herkünften der Proben feststellen. Unterschiede innerhalb von Sternrusstaupopulationen waren sehr gering, bis auf eine Population aus Siebeldingen. Isolate dieser Herkunft ließen sich in zwei Gruppen aufteilen. Die Einteilung in die zwei Gruppen konnte an Hand von 11 Primerpaaren vorgenommen werden, wobei 8 Primerpaare keine auswertbaren Polymorphismen ergaben.

ABELN et al. (2002) vergleicht die AFLP-Technik mit der Analyse eines rDNA-Abschnittes an der Gattung *Phoma*. Sie sequenzierten eine 759 bp lange Region der rDNA mit den Abschnitten ITS1, 5,8S und ITS2. Die Variation der Sequenzen ist zwischen verschiedenen *Phoma exigua*-Isolaten in der Regel nur gering. 735 Positionen sind uniform und 36 polymorph. Von den 36 polymorphen Positionen sind 24 nach dem Parsimony-Prinzip uninformativ und 12 informativ. Die Sequenzinformationen erlauben keine Trennung von *P. exigua* zu den nahe verwandten Arten *P. foveata* und *Didymella lycopersici*, während eine Unterscheidung zu anderen Arten wie *P. destructiva* und

anderen Arten möglich ist. Innerhalb der Art *P. exigua* fehlen Sequenzunterschiede nahezu vollständig.

Im Gegensatz zu *P. exigua* konnten anhand der rDNA alle Arten der Gattung *Diplocarpon* getrennt werden. Aber auch bei *Diplocarpon* sind die ITS-Sequenzen auf Artebene sehr ähnlich, so dass eine Trennung innerhalb der Art *D. rosae* in vielen Fällen nicht möglich ist. Nur der Stamm '101' ist gut von den restlichen *D. rosae*-Stämmen an den rDNA-Daten abzutrennen.

Während die Variation der rDNA auf der Artebene *D. rosae*, mit Ausnahme von Stamm '101', gering ist, wurde eine große Variation in den AFLP-Mustern festgestellt. Dieses deckt sich mit den Beobachtungen die ABELN et al. (2002) an *P. exigua* gemacht wurden.

4.2.3. rDNA

Während die Mikrosatelliten- und die AFLP-Marker gut geeignet sind, um Variationen innerhalb der Art *D. rosae* festzustellen, zeichnet sich die Methode der Analyse der rDNA dadurch aus, dass Variationen auf höherer Verwandtschaftsebene verglichen werden können. Damit ist diese Methode geeignet, Verwandtschaftsbeziehungen auf Familienebene sowie auch auf Gattungsebene zu analysieren.

4.2.3.1. rDNA im Genom von *D. rosae*

Die Sequenz der rDNA ist innerhalb der Gattung *Diplocarpon* polymorph. Polymorphismen sind zwischen den 4 Arten und teilweise auch innerhalb der Art *D. rosae* vorhanden. Innerhalb eines Stammes konnten keine Variationen in der rDNA festgestellt werden.

Im Genom sind mehrere Kopien des rDNA-Abschnittes vorhanden. Bei dem Modellorganismus *Neurospora crassa* befinden sich im haploiden Genom ein 6 Megadalton großer Abschnitt mit etwa 190 Kopien der rDNA (FREE et al. 1979).

Zwischen den einzelnen Kopien der rDNA können Polymorphismen auftreten. GANLEY und SCOTT (2002) untersuchten den Endophyt *Epicloë* und konnten Variationen in der Sequenz der 5S rDNA feststellen. Diese Variationen, die innerhalb eines Genoms auftreten, werden auf genetische Rekombinationen zurückgeführt. Gegenläufig dazu findet eine Homogenisierung der Sequenzen statt, so dass die Variationen eliminiert werden. Allerdings erstreckt sich der Prozess der Homogenisierung über einen langen Zeitraum.

In den untersuchten *Diplocarpon*-Arten konnten keine Variationen der rDNA innerhalb eines Genoms festgestellt werden. Dieses deutet auf eine geringe genetische

Rekombinationsrate hin. Dieses deckt sich mit der Tatsache, dass teleomorphe Strukturen nur sehr selten gefunden wurden. Auch spricht vieles gegen eine somatische genetische Rekombination bei *D. rosae*. Eine Anastomosenbildung konnte trotz intensiver mikroskopischer Studien nicht beobachtet werden, noch wird dieses in der Literatur für *D. rosae* erwähnt.

Während keine Variationen in den Sequenzen innerhalb der *D. rosae*-Stämme festgestellt werden konnten, sind Variationen zwischen den Stämmen teilweise vorhanden. Neben einem relativ homogenen Cluster mit den Stämmen '102', '104', '109', '114', '117', '118', '120', '121' und '123', die sich durch wenige bis zu keiner Variationen auszeichnen, fällt besonders der *D. rosae* Stamm '101' auf.

Dieser Stamm unterscheidet sich deutlich von den anderen *D. rosae*-Stämmen. Die Unterschiede zeigen sich nicht nur in der rDNA, sondern wurden auch in der AFLP- sowie in der Mikrosatellitenanalyse festgestellt. Die genetische Differenz zu allen anderen untersuchten Stämmen ist so groß, dass eine taxonomische Trennung gerechtfertigt ist. Ob der Stamm eine neue Art oder eine Subspezies innerhalb der Art *D. rosae* darstellt, sollte durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Während die rDNA-Daten einen monophyletischen Ursprung des Stammes '101' mit den anderen *D. rosae*-Stämmen nahe legen, deuten die AFLP-Daten auf einen polyphyletischen Ursprung hin. Da die AFLP-Marker zu polymorph sind und zu wenige gemeinsame Banden zwischen dem Stamm '101' und den übrigen Vertretern der Gattung *Diplocarpon* auftreten, würde dieses eine Überinterpretation der AFLP-Daten bedeuten.

4.2.3.1. Einordnung der Gattung *Diplocarpon*

Diplocarpon wurde 1912 erstmalig von WOLF beschrieben mit der Typusart *Diplocarpon rosae*. Nach HAWKSWORTH et al. (1995) besteht die Gattung aus 6 Arten, von denen 4 in die eigenen Untersuchungen mit einbezogen wurden. Es wurden Bereiche der rDNA sequenziert und für phylogenetische Untersuchungen genutzt. Anhand der Sequenzen ließen sich Stammbäume erstellen, die die systematische Stellung der Gattung *Diplocarpon* widerspiegeln. Als die nächsten Verwandten der Gattung *Diplocarpon* wurden die Taxa *Ramulispora*, *Rhynchosporium* und *Pyrenopeziza brassicae* ausgemacht. Auch diese werden der Familie der Dermateaceae zugerechnet (HAWKSWORTH 1995), so dass die Untersuchungen die Einordnung in die Familie Dermateaceae bestätigen.

Dem gegenüber steht die Gruppe der Gattung *Dermea* und *Pezicula*, die ebenfalls der Dermateaceae zugeordnet werden, aber von der ersten Gruppe deutlich getrennt sind.

Eine Aufspaltung der Familie der Dermateaceae scheint notwendig, da es sich vermutlich um eine polyphyletische Gruppe handelt. Dabei sollte die Gruppe um *Dermea* aus Prioritätsgründen in der Familie Dermateaceae verbleiben und der Cluster um *Diplocarpon* umgruppiert werden.

GOODWIN (2002), der die Verwandtschaftsverhältnisse von *Rhynchosporium secalis* untersuchte, hält eine Einordnung dieser Taxa in die Familie Mollisiaceae für möglich, allerdings sind noch einige zusätzliche Studien notwendig, um die taxonomischen Verhältnisse endgültig zu klären.

Neben den nomenklaturischen traten noch weitere Probleme bei der Studie der Familie der Dermateaceae auf. Bei der Analyse der Verwandtschaftsverhältnisse fiel auf, dass in der GenBank (NCBI) keine Sequenzen der relevanten Arten vorhanden sind. Dementsprechend liefert eine Suche nach entsprechenden Sequenzen mit dem Programm Blast keine aufschlussreichen Daten (GOODWIN 2002). Relevante Daten konnten aber von anderen Datenbanken (z.B. Treebase) heruntergeladen werden.

4.2.4. Risikofaktor von *Diplocarpon rosae* und deren Bedeutung für die Resistenzzüchtung

Die Strategie in der Resistenzzüchtung sollte auf die Biologie und die Populationsstruktur des Erregers abgestimmt sein, um nachhaltige Resistenz zu erzielen. Erreger sind in der Lage auf neue Umwelteinflüsse zu reagieren und können Resistenzen z.B. durch spontane Mutationen überwinden. Die Wahrscheinlichkeit, dass Resistenzen überwunden werden, wird durch die Biologie und die Populationsstruktur beeinflusst. Entscheidende Faktoren sind dabei die Rate der genetischen Rekombination, die Ausbreitungsgeschwindigkeit und die Populationsgröße. Der Sternrusstau hat eine sehr niedrige genetische Rekombinationsrate und die Ausbreitung über größere Distanzen ist eingeschränkt, da die Verbreitung im wesentlichen über Spritzwasser stattfindet.

Ordnet man den Sternrusstau in das Risikomodell von McDONALD und LINDE (2002) ein, so besitzt dieser ein niedriges Gefahrenpotential durch Mutation oder Genfluss eine Resistenz zu brechen (siehe Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3: Risikomodell modifiziert nach McDONALD und LINDE (2002)

Erreger	Wanderung der Gene/Genotyp		Reproduktions-system	effektive Populationsgröße
	sexuell	asexuell		
<i>Diplocarpon rosae</i> *1	sehr niedrig	niedrig	fast ausschließlich asexuell	mittel
<i>Erysiphe graminis</i> *2	niedrig	hoch	beide	groß
<i>Magnaportha grisea</i> *2	mittel	hoch	größtenteils asexuell	groß
<i>Phytophthora infestans</i> *2	hoch	hoch	homothallisch mit niedriger Auskreuzung	mittel-groß
<i>Tapesia yallundae</i> *2	mittel	mittel	beide, meist clonal	mittel-groß
<i>Rhynchosporium secalis</i> *2	hoch	mittel	beide ?	mittel

*1: eigene Einstufung

*2: nach McDONALD und LINDE (2002)

Somit können auch Strategie in der Resistenzzüchtung angewendet werden, die bei anderen Erregern, z.B. Echten Mehltau, nicht zu dauerhaften Resistenzen führen. So ist eine Kombination von Resistenzgenen durch „Pyramidisierung“ nach McDONALD und LINDE (2002) nicht unbedingt notwendig (siehe Abbildung 4.1).

Obwohl dem Sternrusstau nach dem Modell ein nur niedriges Gefahrenpotential zugeordnet wird, hat der Sternrusstau des Stammes '101' das monogene Resistenzgen *Rdr1* nach wenigen Jahren überwunden (MALEK-PODJASKI 1999). Der Risikofaktor „spontane Mutation“ ist hierfür aber wahrscheinlich nicht entscheidend gewesen.

Der Stamm '101' hat sich nicht in jüngster Zeit durch eine spontane Mutation von den anderen bekannten und untersuchten Stämmen abgetrennt, da die genetische Distanz zu den anderen Stämmen dafür zu groß ist. Vermutlich wurde der Erreger auf das Gelände des Institutes mit einem anderen Wirt eingeschleppt.

Wie und wann dieser Stamm entstanden ist, ist zur Zeit nicht eindeutig zu klären. Vermutlich hat aber eine Koevolution zwischen der Gattung *Diplocarpon* und dem Wirt stattgefunden und der Erreger hat sich parallel zu den Rosaceae entwickelt. Mit der Entstehung der Gattung *Rosa*, vor mindestens 37 Millionen Jahren, hat sich vermutlich die Art *D. rosae* gebildet und wurde von den anderen *Diplocarpon* spp. separiert. Erst anschließend hat sich der Stamm '101' abgetrennt. Ob dieser Erreger sich durch Hybridisierung mit anderen Arten oder durch eine separate Evolution entwickelt hat, lässt sich nur durch weitere vergleichende Sequenzanalysen sicher klären.

Sicher ist aber, dass der Sternrusstau in einer langen Koevolution mit den Rosen sich zu einem hoch spezialisierten Parasiten entwickelt hat, mit dem Potential sich auf neue Umweltbedingungen anzupassen.

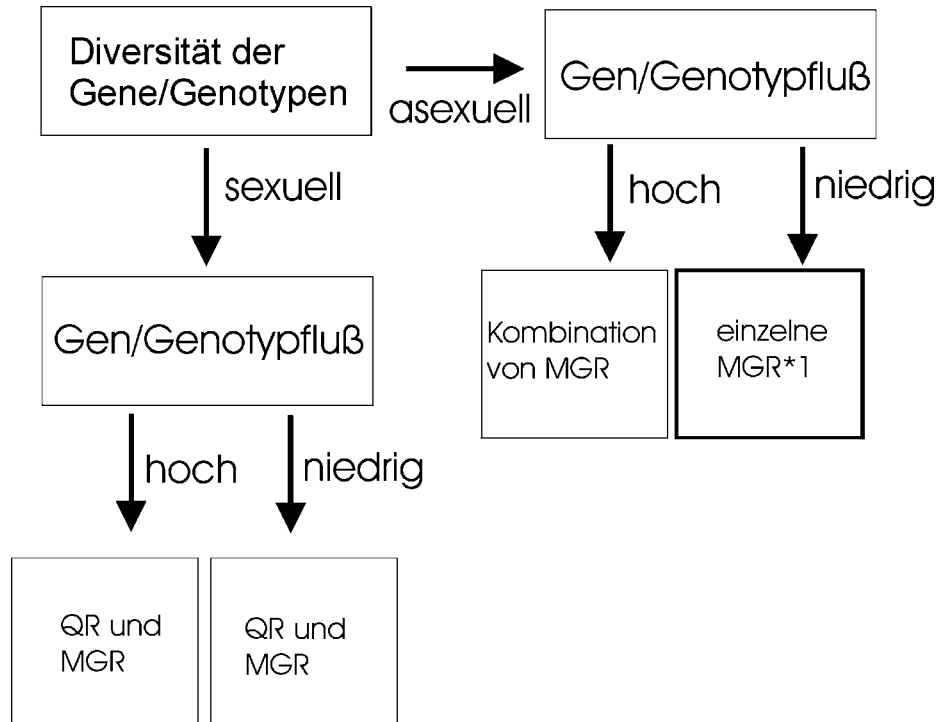


Abbildung 4.1: Diagramm zur Entscheidungshilfe bei der Resistenzzucht modifiziert nach McDONALD und LINDE (2002). QR: Quantitative Resistenz; MGR: Monogene Resistenz; *1: Einordnung von *Diplocarpon rosae*.

5. Literatur

- Abeln, E. C. A., M. A. de Pagter, G. J. M. Verkley. 2000. Phylogeny of *Pezizula*, *Dermea* and *Neofabraea* inferred from partial sequences of the nuclear ribosomal RNA gene cluster. *Mycologia* 92: 685-693.
- Abeln, E. C. A., A. M. Stax, J. de Gruyter, H. A. van der AA. 2002. Genetic differentiation of *Phoma exigua* varieties by means of AFLP fingerprints. *Mycol. Res.* 106: 419-427.
- Aronescu, A. 1934. *Diplocarpon rosae*: From spore germination to haustoria formation. *Bull. Torrey bot. Club* 61: 291-329.
- Asai, T., J. M. Tone, J. E. Heard, Y. Kovtun, P. Yorgey, J. Sheen, F. M. Ausubel. 2000. Fumonisin B1-induced cell death in *Arabidopsis* protoplasts requires jasmonate-, ethylene, and salicylate-dependent signaling pathways. *The Plant Cell* 12: 1823-1835.
- Aufauvre-Brown, A., C. M. Tang, D. W. Holden. 1993. Detection of gene-disruption events in *Aspergillus* transformants by polymerase chain reaction direct from conidiospores. *Curr. Genet.* 24: 177-178.
- Bent, A. 1996. Plant disease resistance genes: function meets structure. *The Plant Cell* 8: 1757-1771.
- Blom, T. J., M. J. Tsujita. 2003. Cut rose production. In: Roberts, A. V., T. Debener, S. Gudín, eds. *Encyclopedia of rose science*. Elsevier Academic press, Oxford, p: 594-600.
- Bock, C. H., P. H. Thrall, C. L. Brubaker, J. J. Burdon. 2002. Detection of genetic variation in *Alternaria brassicicola* using AFLP fingerprinting. *Mycol. Res.* 106: 428-434.
- Braun, E. J., R. J. Howard. 1994. Adhesion of fungal spores and germlings to host plant surface. *Protoplasma* 181: 202-212.
- Brondani, C., R. P. V. Brondani, L. da Ressurreicao, M. E. Ferreira. 2000. Development of microsatellite markers for the genetic analysis of *Magnaporthe grisea*. *Genetics and Molecular Biology* 23: 753-762.
- Bucheli, E. B. Gautschi, J. A. Shykoff. 1998. Isolation and characterization of microsatellite loci in the anther smut fungus *Microbotryum violaceum*. *Molecular Ecology* 7: 665-666.
- Burgess, T., M. J. Wingfield, B. W. Wingfield. 2001. Simple sequence repeat distinguish among morphotypes of *Sphaeropsis sapinea*. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 354-362.
- Carlson-Nilsson, B. U. 2002. Variation in *Rosa* with emphasis on the improvement of winter hardiness and resistance to *Marssonina rosae* (Blackspot). Dissertation Alnarp, Schweden.
- Cairns, T. 2003. Horticultural classification schemes. In: Roberts, A. V., T. Debener, S. Gudín, eds. *Encyclopedia of rose science*. Elsevier Academic press, Oxford, p: 117-124.
- Clements, M. A., H. Muir, P. J. Cribb. 1986. A preliminary report on the symbiotic germination of European orchids. *Kew Bull.* 41: 437-445.
- Cubero, O. F., A. Crespo, J. Fatehi, P. D. Bridge. 1999. DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized and other fungi. *Pl. Syst. Evol.* 216: 243-249.

- Debener, T. 2000. Strategies for the introduction of disease resistance genes from wild rose species into cultivated varieties. *Historic Rose Journal* 19: 29-33.
- Debener, T., R. Drewes-Alvarez, K. Rockstroh. 1998. Identification of five physiological races of blackspot, *Diplocarpon rosae* Wolf on roses. *Plant breeding* 117: 267-270.
- Dickman, M. B., Y. K. Park, T. Ottersdorf, W. Li, T. Clemente, R. French. 2001. Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 6957-6962.
- Dodge, B. O. 1931. A further study of the morphology and life history of the rose black spot fungus. *Mycologia* 23: 446-462.
- Drewes-Alvarez, R. 1992. Untersuchungen am Pathosystem Sternrusstau (*Marssonina rosae* (Lib.) Died.)-Rose (*Rosa* L.) zur Klärung der Frage nach pilzlichen Rassen und zur Übertragung der Resistenz aus der diploiden *Rosa multiflora* Thunb. auf tetraploide Gartenrosen. Dissertation Hamburg.
- Ellis, J., P. Dodds, T. Pryor. 2000. Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 278-284.
- Ferreira, A. V. B., N. L. Glass. 1996. PCR from fungal spores after microwave treatment. *Fungal genetics newsletter* 43: 25-26.
- Flor, H. H. 1947. Host-parasite interactions in flax rust-It's genetics and other implications. *Phytopathology* 45: 680-685.
- Free, S. J., P. W. Rice, R. L. Metzberg. 1979. Arrangement of the genes coding for ribosomal ribonucleic acids in *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology* 137: 1219-1226.
- Frick, L. 1943. Untersuchungen über Biologie und Pathogenität von *Diplocarpon rosae* (Lib.) Wolf. *Phytopathol. Z.* 14: 525-591.
- Frohne, D., U. Jensen. 1998. Systematik des Pflanzenreiches. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart p: 166- 172.
- Ganley, A. R. D., B. Scott. 2002. Concerted evolution in the ribosomal genes of an *Epicloë* endophyte hybrid: Comparison between tandemly arranged rDNA and dispersed 5s rrn genes. *Fungal Genetics and Biology* 35: 39-51.
- Gibson, R. W. 1971. Glandular hairs providing resistance to aphids in certain wild potato species. *Ann. Appl. Biol.* 68: 113-119.
- Goodwin, S. B. 2002. The barley scald pathogen *Rhynchosporium secalis* is closely related to the discomycetes *Tapesia* and *Pyrenopeziza*. *Mycol. Res.* 106: 645-654.
- Hashidoko, Y. 1996. The phytochemistry of *Rosa rugosa*. *Phytochemistry* 43: 535-549.
- Hattendorf, A., M. Linde, L. Mattiesch, T. Debener. 2004. Genetic analysis of rose resistance genes and their localisation in the rose genome. *Acta Horticulturae* 651: 123-130.
- Hawksworth, D. L., P. M. Kirk, B. C. Sutton, D. N. Pegler. 1995. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungus. CAB International, Wallingford, UK.
- Heinrichs, F. 2002. International statistics flowers and plants. *International Association of Horticultural Producers* 50: 1-150.

- Hood, M. E., H. D. Shew. 1996. Applications of KOH-aniline blue fluorescence in the study of plant-fungal interactions. *Phytopathology* 86: 704- 708.
- Horst, R. K. 1989: Compendium of rose diseases. The American Phytopath. Soc., Minnesota, USA.
- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 44: 223-270.
- Jenkins, W. R. 1954. Variation in the pathogenicity and physiology of *Diplocarpon rosae* (Lib.) Wolf, the rose blackspot pathogen. Dissertation, Maryland, USA.
- Jukes, T. H. and C. R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules. In H. N. Munro, ed., *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, New York, USA p: 21-132.
- Karlik, J. F., J. O. Becker, H. B. Pemberton, U. K. Schuch. 2003. Field rose production. In: Roberts, A. V., T. Debener, S. Gudín, eds. *Encyclopedia of rose science*. Elsevier Academic press, Oxford, p: 580-587.
- Knight, C., B. E. J. Wheeler. 1978a. Evaluating the resistance of roses to blackspot. *Phytopath. Z.* 91: 218-229.
- Knight, C., B. E. J. Wheeler. 1978b. The germination of *Diplocarpon rosae* on different rose cultivars. *Phytopath. Z.* 91: 346-354.
- Kortekamp, A., E. Zyprian. 1999. Leaf hairs as a basic protective barrier against downy mildew of grape. *J. Phytopathology* 147: 453-459.
- Kothera, R., A. P. Keinath, R. A. Dean, M. W. Farnham. 2003. AFLP analysis of a world collection of *Didymella bryoniae*. *Mycol. Res.* 107: 297-304.
- Krüssmann, G. 1986. *Rosen, Rosen, Rosen*. Verlag Paul Parey Berlin p. 448.
- Lee, S. B., J. W. Taylor. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White, eds. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, USA: p: 282-287.
- Levin, D. A. 1973. The role of trichomes in plant defense. *The Quarterly Review of Biology* 48: 3-15.
- Lynch, M. 1990. The similarity index and DNA fingerprinting. *Mol. Biol. Evol.* 7: 478-484.
- MacGinitie, H. D. 1953. Fossil plants of the Florissant Beds, Colorado. Carnegie Institution of Washington, Publication 599: 1-198.
- Majer, D., R. Mithen, B. G. Lewi, P. Vos, R. P. Oliver. 1996. The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycol. Res.* 100: 1107-1111.
- Malek-Podjaski, B. 1999. Erschließung von Resistenzquellen gegenüber dem Erreger des Sternrußtau (*Diplocarpon rosae* Wolf) an Rosen unter Verwendung molekularer Marker. Dissertation, Hannover.
- Malek, B. v., T. Debener. 1998. Genetic analysis of resistance to blackspot (*Diplocarpon rosae*) in tetraploid roses. *Theor. Appl. Genet.* 96:228-231.

- Martin, J. T., R. F. Batt, R. T. Burchill. 1957. Defence mechanism of plants against fungi, fungistatic properties of apple leaf wax. *Nature* 180: 796-799.
- Martin, J. T. 1964. Role of cuticle in the defense against plant disease. In: Horsfall, J. G., K.F. Baker, eds.: *Annual review of phytopathology*, Palo Alto, Canada Seite: 81- 100.
- McDonald, B., C. Linde. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40: 349-379.
- Meng, X., W. Chen. 2001. Applications of the AFLP and ISSR techniques in detecting genetic diversity in the soybean stem rot pathogen *Phialophora gregata*. *Mycol. Res.* 105: 936-940.
- Moon, C. D., B. A. Tapper, B. Scott. 1999. Identification of *Epicloë* endophytes in planta by a microsatellite-based PCR fingerprinting assay with automated analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1268-1279.
- Nauta, M. M., B. Spooner. 1999. British Dermateaceae: 1. Introduction. *Mycologist* 13: 3-6.
- Pan, Q., J. Wendel, R. Fluhr. 2000. Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. *J. Mol. Evol.* 50: 203-213.
- Paniego, N., M. Echaide, M. Munoz, L. Fernandez, S. Torales, P. Faccio, I. Fuxan, M. Carrera, R. Zandomeni, E. Y. Suarez, H. E. Hopp. 2002. Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Genome* 45: 34-43.
- Proll, T., O. Blechert, A. Dohm. 2002. Pilzliche Blattkrankheiten an Rosen (Sternrußtau, Echter oder doch Falscher Mehltau?). *Rosenjahrbuch VDR, Baden-Baden* p: 157-179
- Reddy, S., J. A. Spencer, S. E. Newman. 1992. Leaflet surfaces of blackspot-resistant and susceptible roses and their reactions to fungal invasion. *HortScience* 27: 133-135.
- Roberts, J. J., D. L. Long, R. E. Wilkinson, G. G. Ahlstrand. 1990. Effects of wheat leaf pubescence on infection by *Puccinia recondita*. *Phytopathology* 80: 1046.
- Sambrook, J., D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schult, P. 1994. Untersuchungen zum Nachweis genetischer Unterschiede von Isolaten des Sternrusstaupilzes (*Marssonina rosae* (Lib.) Died.). Diplomarbeit, Hamburg.
- Shishkin, B. K., S. V. Yuzepchuk. 1941. Volume X: Rosaceae-Rosoideae, Prunoideae. In: Komarov, V. L., eds. *Flora of the USSR*. Botanical Institute of the academy of sciences of the USSR, Moskau, p: 322-379.
- Spethmann, W., B. Feuerhahn. 2003. Species crosses. In: Roberts, A. V., T. Debener, S. Gudin, eds. *Encyclopedia of rose science*. Elsevier Academic press, Oxford, p: 299-312.
- Svejda, F. J., A. T. Bolton. 1980. Resistance of rose hybrids to three races of *Diplocarpon rosae*. *Can. J. of plant pathology* 2: 23-25.
- Tenzer, I., S. d. Ivanissevich, M. Morgante, C. Gessler. 1999. Identification of microsatellite markers and their application to population genetics of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 89: 748-753.

- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, M. Zabeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.
- Wang, H., J. Li, R. M. Bostock, D. G. Gilchrist. 1996. Apoptosis: A functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *The Plant Cell* 8: 375-391.
- Wenefrida, I., J. A. Spencer. 1993. *Marssonina rosae* variants in Mississippi and their virulence on selected rose cultivars. *Plant Dis.* 77: 246-248.
- Wiggers, R. J., J. G. West, J. Taylor. 1997. Conidial germination and infection by *Diplocarpon rosae* on susceptible and resistant rose species. *Mycologia* 89: 103-108.
- Wiegand, J. 2001. Untersuchungen zum Erreger des Sternrußtaus-*Diplocarpon rosae* Wolf an Rosen. Diplomarbeit, Dresden.
- Wissemann, V. 2003. Conventional Taxonomy (Wild Roses). In: Roberts, A. V., T. Debener, S. Gudin, eds. *Encyclopedia of rose science*. Elsevier Academic press, Oxford, p: 111-117.
- Wolf, F. A. 1912. The perfect stage of *Actinonema*. *Botanical Gazette* 54: 218-234.
- Wylie, A. P. 1954. The history of garden roses. *Journal of the Royal Horticultural Society* 79: 555-571.
- Xu, J.-R., J. E. Hamer. 1995. Assessment of *Magnaporthe grisea* mating type by spore PCR. *Fungal Genetics Newsletter* 42: 80.
- Yokoya, K., K. I. Kandasamy, S. Walker, Z. Mandegaran, A. V. Roberts. 2000. Resistance of roses to pathotypes of *Diplocarpon rosae*. *Ann. appl. Biol.* 136: 15-20.
- Young, N. D. 2000. The genetic architecture of resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 285-290.

6. Anhang

6.1 Software

Image Analysis Version 4.1h	llicor.com
Clustalx Version 1.8	ftp.embl-heidelberg.de
Bioedit Version 5.0.9	mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html
Staden	staden.sourceforge.net
Tandem Repeats Finder 3.21	c3.biomath.mssm.edu
Mega2	megasoftware.net
Phylip Version 3.5c	evolution.genetics.washington.edu
NTSYSpc Version 2.10s	exetersoftware.com

6.2 Datenbanken und Kultursammlungen

CBS	www.cbs.knaw.nl
GenBank	www.ncbi.nlm.nih.gov
EMBL	www.ebi.ac.uk/embl
NBRC	www.nbrc.nite.go.jp
TreeBASE	www.treebase.org
U.S.-Department of Agriculture	www.ars.usda.gov

6.3. Lösungen und Medien

6.3.1. Nährmedien

IPTG/ X-Gal-Ampicillin-LB Medium (pro Liter)

NaCl	10 g
Tryptone	10 g
Hefeextrakt pH=7.0	5 g
Ampicillin	50 mg
IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalactosid)	0,5 mM
X-Gal	80mg

Ampicillin-LB Medium (pro Liter)

NaCl	10 g
Tryptone	10 g
Hefeextrakt pH=7.0	5 g
Ampicillin	50 mg

LB-Lösung (pro Liter)

NaCl	10 g
Tryptone	10 g
Hefeextrakt	5 g
pH=7.0	

Maltose-MgSO₄-LB-Lösung (pro Liter)

NaCl	10 g
Tryptone	10 g
Hefeextrakt	5 g
Maltose	0,2%
MgSO ₄	10mM
pH=7.0	

Top-Agar

NZY-Lösung	
Agarose	0,7%

NZY-Lösung (pro Liter)

NaCl	5 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2 g
Hefeextrakt	5 g
NZ-amine	10 g
pH=7.5	

SM-Puffer (pro Liter)

NaCl	5,8 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2 g
1 M Tris-HCl (pH= 7,5)	50 ml
Gelatine (2%)	5 ml

SOC

Pepton	2%
Hefeextrakt	0,5%
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
Glukose	20 mM
MgSO ₄	10 mM
MgCl ₂	10 mM

MOM-Agar (pro Liter) (CLEMENTS et al. 1986)

Ca(NO ₃) ₂ * 4 H ₂ O	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
KCl	0,1 g
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,1 g
Fetrilon	16 mg
Hefeextrakt	0,1 g
Saccharose	2,0 g
Gemahlener Hafer	3,5 g
Agar	15,0 g
pH=5,8	

Biomalzagar (pro Liter)

Biomalz	20 g
Agar	15 g
pH=6	

6.3.2. Färbelösungen**Anilinblau-Färbelösung (HOOD & SHEW 1996)**

Anilinblau	0.05%
K ₂ HPO ₄	0.067 M
Aqua bidest.	1 l

Baumwollblau-Färbelösung

Baumwollblau	1 g
Milchsäure	40 ml
Glycerin	80 ml
Aqua bidest.	40 ml

6.3.3. Elektrophoresegele**Agarosegel (1,5%)**

Agarose	1,5%
Ethidiumbromid	0,5 mg
TAE	1 l

Sequenziergel (7,5%)

Rapid Gel Solution 40% (USB)	6,3 ml
Harnstoff	14 g
long run TBE (10x)	3,3 ml
Aqua bidest.	18,7 ml
DMSO (Dimethylsulfoxid)	333 µl
Ammoniumpersulfat (10%)	235 µl
TEMED (Tetramethylethylen-diamid)	35 µl

Mikrosatellitengel (6%)

Harnstoff	7,56 g
Aqua bidest.	10 ml
long run TBE	1,8 ml
Acrylamid (Roth rotiphorese Gel 40)	2,6 ml
Ammoniumpersulfat	128 µl
TEMED	18 µl

AFLP-Gel (6%)

Harnstoff	10,5 g
Aqua bidest.	14 ml
long run TBE (10X)	2,5 ml
Acrylamid (Roth rotiphorese Gel 40)	3,8 ml
Ammoniumpersulfat (10%)	175 µl
TEMED	25 µl

Polyacrylamidgel für Silberfärbung (5%)

Acrylamid (40%)	12 ml
Harnstoff	42 g
long run TBE	10 ml
Aqua bidest.	42 ml
Ammoniumpersulfat (10%)	400 µl
TEMED	50 µl

Ladepuffer für Agarosegele

Bromphenol-blau	0.25%
Glycerin	30%

Ladepuffer für Acrylamidgele

Formamid (99,5%)	98 ml
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	10 mM
Pararosanilin	0,025%

Ladepuffer für Acrylamidgele mit Silberfärbung

Bromphenol Blue	0,3%
Xylene Cyanol FF	0,3%
EDTA	10 mM
deionized formamide	97,5%

Methacryloxypropyltrimethoxysilan

Ethanol	5 ml
Essigsäure (10%)	150 µl
Methacryloxypropyltrimethoxysilan	15 µl

Repellent Silan

Dimethyldichlorosilan	5%
Chloroform	95%

Stopplösung für Silberfärbung

Eisessig	7,5%
Aqua bidest.	1 l

Färbelösung für Silberfärbung

Silbernitrat	1g
Formaldehyd (37%)	1,5 ml
Aqua bidest.	1l

Entwickler für Silberfärbung

Natriumcarbonat	30g
Formaldehyd (37%)	1,5 ml
Natriumthiosulfat-Lösung (0,2 g/ml)	8 µl
Aqua bidest.	1 l

6.3.4. Puffer und andere Lösungen**CTAB (DNA-Extraktionspuffer):**

Hexadecyltrimethylammonium bromid (CTAB) 2%	
Tris-HCl	100 mM
NaCl	1,4M
EDTA	20 mM

Natriumacetat

Natriumacetat pH=5,2	3 M
-------------------------	-----

TAE-Puffer

Tris	40 mM
EDTA	1 mM
Aqua bidest.	1 l

TE-Puffer

Tris-HCl (pH= 8.0)	10 mM
EDTA (pH=8.0)	1 mM

10 x RL Buffer

Tris HCl	100 mM
Magnesiumacetat	100 mM
Kaliumacetat	500 mM
DTT Dithiothreitol	50 mM
pH=7.5	

10 X Williamspuffer für PCR

Tris-HCl	100 mM
KCl	500 mM
MgCl	20 mM
Gelantine	0,01%

10 X Longrun TBE

Tris	162 g
Boric acid	27,5g
Na ₂ EDTA	9.3 g
Aqua bidest.	1 l

20 x SSC

NaCl	175.3 g
Natriumcitrat	88.2 g
Aqua bidest.	1 l
pH=7.0	

20 x SSPE

NaCl	175.3g
Na H ₂ PO ₄ x H ₂ O	27.6 g
EDTA	7.4 g
Aqua bidest.	1 l
pH=7.4	

100 x Denhardt

Ficoll	20 g
Polyvinylpyrrolidone	20 g
BSA	20 g
Aqua bidest.	1 l

6.3.5. Plasmidpräparation**Lösung 1**

Glukose	50 mM
Tris/HCl	25 mM
EDTA (pH=8)	10 mM

Lösung 2

NaOH	0,2 N
SDS	1%

Lösung 3

Kaliumacetat	3 M
Essigsäure	11,5%

6.3.6. Hybridisierung**Denaturierungslösung**

NaCl	1,5 M
NaOH	0,5 M

Neutralisierungslösung

NaCl	1,5 M
Tris-HCl (pH=8)	0,5 M

Waschlösung

Tris-HCl (pH=7,5)	0,2 M
SSC	2 x

6.4. Primer

LS266 (Abeln et al. 2000)

5'-TCCCTTTCAACAATTTACAG-3'

NS7 (Abeln et al. 2000)

5'-GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC-3'

ITS4-800 (fluoreszenzmarkiert) (Abeln et al. 2000)

5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

Oli14-700 (fluoreszenzmarkiert) (Abeln et al. 2000)

5'-ATAACAGGTCTGTGATGCC-3'

M13 uni-800 (fluoreszenzmarkiert)

5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'

M13 rev-700 (fluoreszenzmarkiert)

5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'

HindIII-Adapter+1 (50 pmol/μl) für Ligation

5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'

5'-AGCTGGTACGCAGTCTAC-3'

MseI-Adapter+1 (50 pmol/μl) für Ligation

5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'

5'-TACTCAGGACTCAT-3'

HindIII-Primer+1 für Preamplifikation

5'-AGACTGCTGACCAGCTT-3'

MseI-Primer+1 für Preamplifikation

5'-GACGATGAGTCCTGAGTAA-3'

HindIII-Primer+1 (fluoreszenzmarkiert mit N800) für die AFLP-Endreaktion

5'-GACTGCGTACCAGCTTAAT-3'

5'-GACTGCGTACCAGCTTAC-3'

5'-GACTGCGTACCAGCTTCAG-3'

5'-GACTGCGTACCAGCTTCGA-3'

5'-GACTGCGTACCAGCTTCGT-3'

MseI-Primer+1 für die AFLP-Endreaktion

5'-GATGAGTCCTGAGTAAAAT-3'

5'-GATGAGTCCTGAGTAAACT-3'

5'-GATGAGTCCTGAGTAACGA-3'

5'-GATGAGTCCTGAGTAACTG-3'

5'-GATGAGTCCTGAGTAAGGT-3'

5'-GATGAGTCCTGAGTAAGTG-3'

5'-GATGAGTCCTGAGTAATGT-3'

6.5. Sequenz-Alignment des rDNA-Bereiches verschiedener Stämme der Gattung *Diplocarpon*

```

101      TGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCAAGTCA
102      TGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCAAGTCA
104      TGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCAAGTCA
109      TGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCAAGTCA
114      TGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCAAGTCA
117      TGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCAAGTCA
118      TGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCAAGTCA
120      TGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCAAGTCA
121      TGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCAAGTCA
123      TGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCAAGTCA
MALI    TGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCAAGTCA
EARL    TGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCAAGTCA
MESP    TGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCAAGTCA
*****

101      TCAGCTTGCGCTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATT
102      TCAGCTTGCGCTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATT
104      TCAGCTTGCGCTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATT
109      TCAGCTTGCGCTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATT
114      TCAGCTTGCGCTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATT
117      TCAGCTTGCGCTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATT
118      TCAGCTTGCGCTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATT
120      TCAGCTTGCGCTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATT
121      TCAGCTTGCGCTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATT
123      TCAGCTTGCGCTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATT
MALI    TCAGCTTGCGCTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATT
EARL    TCAGCTTGCGCTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATT
MESP    TCAGCTTGCGCTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATT
*****

101      GAATGGCTAAGTGAGGCTTTTCGGACCGGCCAGAGAGAGTGGCAACACTCCCTCAGGGCT
102      GAATGGCTAAGTGAGGCTTTTCGGACCGGCCAGAGAGAGTGGCAACACTCCCTCAGGGCT
104      GAATGGCTAAGTGAGGCTTTTCGGACCGGCCAGAGAGAGTGGCAACACTCCCTCAGGGCT
109      GAATGGCTAAGTGAGGCTTTTCGGACCGGCCAGAGAGAGTGGCAACACTCCCTCAGGGCT
114      GAATGGCTAAGTGAGGCTTTTCGGACCGGCCAGAGAGAGTGGCAACACTCCCTCAGGGCT
117      GAATGGCTAAGTGAGGCTTTTCGGACCGGCCAGAGAGAGTGGCAACACTCCCTCAGGGCT
118      GAATGGCTAAGTGAGGCTTTTCGGACCGGCCAGAGAGAGTGGCAACACTCCCTCAGGGCT
120      GAATGGCTAAGTGAGGCTTTTCGGACCGGCCAGAGAGAGTGGCAACACTCCCTCAGGGCT
121      GAATGGCTAAGTGAGGCTTTTCGGACCGGCCAGAGAGAGTGGCAACACTCCCTCAGGGCT
123      GAATGGCTAAGTGAGGCTTTTCGGACCGGCCAGAGAGAGTGGCAACACTCCCTCAGGGCT
MALI    GAATGGCTAAGTGAGGCTTCTCGGACCGGCCAGAGAGAGTGGCAACACTCCCTCAGGGCT
EARL    GAATGGCTAAGTGAGGCTTCTCGGACCGGCCAGAGAGAGTGGCAACACTCCCTCAGGGCT
MESP    GAATGGCTAAGTGAGGCTTCTCGGACCGGCCAGAGAGAGTGGCAACACTCCCTCAGGGCT
*****

101      GGAAAGTTGTACAACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAG
102      GGAAAGTTGTACAACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAG
104      GGAAAGTTGTACAACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAG
109      GGAAAGTTGTACAACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAG
114      GGAAAGTTGTACAACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAG
117      GGAAAGTTGTACAACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAG
118      GGAAAGTTGTACAACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAG
120      GGAAAGTTGTACAACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAG
121      GGAAAGTTGTACAACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAG
123      GGAAAGTTGTACAACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAG
MALI    GGAAAGTTGTACAACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAG

```

EARL GGAAAGTTGTACAAACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAG
 MESP GGAAAGTTGTACAAACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAG

101 TGAACCTGCGGAAGGATCATTAAACATAGACACACAGCCTGTGCGGGTTCGCCAGACGGGC
 102 TGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGTAGACCCA--GCCTGTCGCCGGTTCG-----GC
 104 TGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGTAGACCCA--GCCTGTCGCCGGTTCG-----GC
 109 TGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGTAGACCCA--GCCTGTCGCCGGTTCG-----GC
 114 TGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGTAGACCCA--GCCTGTCGCCGGTTCG-----GC
 117 TGAACCTGCGGAAGGATCATTACCATAGACCCA--GCCCGTCGCCGGTTCG-----GC
 118 TGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGTAGACCCA--GCCTGTCGCCGGTTCG-----GC
 120 TGAACCTGCGGAAGGATCATTACCATAGACCCA--GCCCGTCGCCGGTTCG-----GC
 121 TGAACCTGCGGAAGGATCATTACCATAGACCCA--GCCCGTCGCCGGTTCG-----GC
 123 TGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGTAGACCCA--GCCTGTCGCCGGTTCG-----GC
 MALI TGAACCTGCGGAAGGATCATTACCATAAC--CCC--GCCCTCGCGGGCCG-----
 EARL TGAACCTGCGGAAGGATCATTACCATGT--CCA--GCGCGGCGCGGGAGCGATCCCCG
 MESP TGAACCTGCGGAAGGATCATTACTAGAC--CACG--GCGCGGCGGGTTCGCCGACCCG
 ***** * * * * *

101 GG---CGGGCTGCCTCTGTACCCGTGCCTACTATAACCGCTGTTGCTTTGGCGAGGCGCCC
 102 GG---CCGGCTGCCTCTGTACCCGTGCCTACCGTACCCCTGTTGCTTTGGCGAGGCGCCC
 104 GG---CCGGCTGCCTCTGTACCCGTGCCTACCGTACCCCTGTTGCTTTGGCGAGGCGCCC
 109 GG---CCGGCTGCCTCTGTACCCGTGCCTACCGTACCCCTGTTGCTTTGGCGAGGCGCCC
 114 GG---CCGGCTGCCTCTGTACCCGTGCCTACCGTACCCCTGTTGCTTTGGCGAGGCGCCC
 117 GG---CCCGCTGCCTCTATAACCCGTGCCTACCGTACCCCTGTTGCTTTGGCGAGGCGCCC
 118 GG---CCGGCTGCCTCTGTACCCGTGCCTACCGTACCCCTGTTGCTTTGGCGAGGCGCCC
 120 GG---CCCGCTGCCTCTATAACCCGTGCCTACCGTACCCCTGTTGCTTTGGCGAGGCGCCC
 121 GG---CCCGCTGCCTCTATAACCCGTGCCTACCGTACCCCTGTTGCTTTGGCGAGGCGCCC
 123 GG---CCGGCTGCCTCTGTACCCGTGCCTACCGTACCCCTGTTGCTTTGGCGAGGCGCCC
 MALI -----CGTATAAC-----ACCCGTGCCTACCCCTACCTCTGTTGCTTTGGCGAGGCGTCC
 EARL GC---CGTGCTGACGCTCTACCCCTTGGCTTAAACACACCCTTGTGCTTTGGCGAGGCGCCC
 MESP CCGCGCGCGGAACCATCTCACCCCTTGCCTACCCCTACCTTCGTTGCTTTGGCGAGGCGCCC
 * **** * * * * * * * * * * * * * * * * *

101 CCC--GGGGGCCAGCGGC--TTCGGCGGCTGCGTCCTCGCCAGAGACCCCAAACCTC---
 102 -TCCGCGGGGCCAGCGGC--TCCGGCGGCTGCGTCCTCGCCAGAGACCCGAAAACCC---
 104 NNCCGCGGGGCCAGCGGC--TCCGGCGGCTGCGTCCTCGCCAGAGACCCGAAAACCC---
 109 CTCCGCGGGGCCAGCGGC--TCCGGCGGCTGCGTCCTCGCCAGAGACCCGAAAACCC---
 114 -TCCGCGGGGCCAGCGGC--TCCGGCGGCTGCGTCCTCGCCAGAGACCCGAAAACCC---
 117 CCCC GCGGGGCCAGCGGC--TCCGGCGGCTGCGTCCTCGCCAGAGACCCGAAAACCC---
 118 CTCCGCGGGGCCAGCGGC--TCCGGCGGCTGCGTCCTCGCCAGAGACCCGAAAACCC---
 120 CCCC GCGGGGCCAGCGGC--TCCGGCGGCTGCGTCCTCGCCAGAGACCCGAAAACCC---
 121 CCCC GCGGGGCCAGCGGC--TCCGGCGGCTGCGTCCTCGCCAGAGACCCGAAAACCC---
 123 TCC-GCGGGGCCAGCGGC--TCCGGCGGCTGCGTCCTCGCCAGAGACCCGAAAACCC---
 MALI CCT--CGGGGCCAGCGGC--TCCGGCTGCTGCGCCCTCGCCAGAGACCCCAAACCTTT
 EARL -TC---GGGCCAGCGCCTTCCGGCTGCTGCGCCCTCGCCAGAGACCCCAAACCTTT
 MESP -GT---GGGCCAGCGGC--TCCGGCTGCTGCGTCCTCGCCAGAGGACCAAACCGC--TC
 ***** * * * * * * * * * * * * * * * * *

101 GTGCCTGTCA-GTGATGTCTGAGNACTATCTA-A-TAGTT-AAAACCTTCAACAACGGAT
 102 ATGCCTATCA-GTGATGTCTGAGNACTATCGA-AATAGTTCAAACTTTCAACAACGGAT
 104 ATGCCTATCA-GTGATGTCTGAGNACTATCGA-AATAGTTCAAACTTTCAACAACGGAT
 109 ATGCCTATCA-GTGATGTCTGAGACTATCGA-AATAGTTCAAACTTTCAACAACGGAT
 114 ATGCCTATCA-GTGATGTCTGAGNACTATCGA-AATAGTTCAAACTTTCAACAACGGAT
 117 ATGCCTGTCA-GTGATGTCTGAGAACTATCGA-AATAGTTCAAACTTTCAACAACGGAT
 118 ATGCCTATCA-GTGATGTCTGAGNACTATCGA-AATAGTTCAAACTTTCAACAACGGAT
 120 ATGCCTGTCA-GTGATGTCTGAGAACTATCGA-AATAGTTCAAACTTTCAACAACGGAT
 121 ATGCCTNTCA-GTGATGTCTGAGNACTATCGA-AATAGTTCAAACTTTCAACAACGGAT
 123 ATGCCTATCA-GTGATGTCTGAGNACTATCGA-AATAGTTCAAACTTTCAACAACGGAT
 MALI GTGTGAATAACGTGATGCTGAGTACGATCAA-A-TCGTG-AAAACCTTCAACAACGGAT
 EARL TTTTGTGA-GTGATGTCTGAGTACGATCAA-A-TCGTG-AAAACCTTCAACAACGGAT
 MESP TTGTTTCGTGA---ATGTCTGAGTACGATAAAACAATCGTG-AAAACCTTCAACAACGGAT
 * * * * * * * * * * * * * * * * *

101 CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG
102 CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG
104 CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG
109 CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG
114 CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG
117 CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG
118 CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG
120 CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG
121 CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG
123 CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG
MALI CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG
EARL CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG
MESP CTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG

101 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCA
102 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCA
104 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCA
109 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCA
114 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCA
117 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCA
118 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCA
120 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCA
121 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCA
123 AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCA
MALI AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCA
EARL AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCA
MESP AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCA

101 TGCCTGTTTCGAGCGTCAT-AACAACCACTCAAGCCCC---CGGCTTGGCCTTGGGGTGCC
102 TGCCTGTTTCGAGCGTCAT-AACAACCACTCCAGCCCCCTTGC GGCTGGGCCCTTGGGGTGCC
104 TGCCTGTTTCGAGCGTCAT-AACAACCACTCCAGCCCCCTTGC GGCTGGGCCCTTGGGGTGCC
109 TGCCTGTTTCGAGCGTCAT-AACAACCACTCCAGCCCCCTTGC GGCTGGGCCCTTGGGGTGCC
114 TGCCTGTTTCGAGCGTCAT-AACAACCACTCCAGCCCCCTTGC GGCTGGGCCCTTGGGGTGCC
117 TGCCTGTTTCGAGCGTCAT-AACAACCACTCCAGCCCCCTTGC GGCTGGGCCCTTGGGGTGCC
118 TGCCTGTTTCGAGCGTCAT-AACAACCACTCCAGCCCCCTTGC GGCTGGGCCCTTGGGGTGCC
120 TGCCTGTTTCGAGCGTCAT-AACAACCACTCCAGCCCCCTTGC GGCTGGGCCCTTGGGGTGCC
121 TGCCTGTTTCGAGCGTCAT-AACAACCACTCCAGCCCCCTTGC GGCTGGGCCCTTGGGGTGCC
123 TGCCTGTTTCGAGCGTCAT-AACAACCACTCCAGCCCCCTTGC GGCTGGGCCCTTGGGGTGCC
MALI TGCCTGTCCGAGCGTCATTAACAACAACCTCAAGCCCT---GGCTTGGTCTTGGGGTGCC
EARL TGCCTGTCCGAGCGTCAT-AACAACCACTCAAGCCCTC---GGCTTGGTCTTGGGGTGCC
MESP TGCCTGTCCGAGCGTCATTAACAACCACTCAAGCCCTG---CGCTTGGTCTTGGGGTGCC

101 CGGC-TCCGGGGCCCTAAAACAGTGGCGGCGCCGGCCCGCCCTGCGCGCAGTAGACCA
102 CGGC-TCCGGGACCCCTAAAATCAGTGGCGGCGCTGGCCGGCCCTGCGCGCAGTAGACCA
104 CGGC-TCCGGGACCCCTAAAATCAGTGGCGGCGCTGGCCGGCCCTGCGCGCAGTAGACCA
109 CGGC-TCCGGGACCCCTAAAATCAGTGGCGGCGCTGGCCGGCCCTGCGCGCAGTAGACCA
114 CGGC-TCCGGGACCCCTAAAATCAGTGGCGGCGCTGGCCGGCCCTGCGCGCAGTAGACCA
117 CGGC-TCCGGGACCCCTAAAATCAGTGGCGGCGCTGGCCGGCCCTGCGCGCAGTAGACCA
118 CGGC-TCCGGGACCCCTAAAATCAGTGGCGGCGCTGGCCGGCCCTGCGCGCAGTAGACCA
120 CGGC-TCCGGGACCCCTAAAATCAGTGGCGGCGCTGGCCGGCCCTGCGCGCAGTAGACCA
121 CGGC-TCCGGGACCCCTAAAATCAGTGGCGGCGCTGGCCGGCCCTGCGCGCAGTAGACCA
123 CGGC-TCCGGGACCCCTAAAATCAGTGGCGGCGCTGGCCGGCCCTGCGCGCAGTAGACCA
MALI CGGC-ATCGGGGGCCCTAAAATCAGTGGCGGCTGCCCGCCGGCCCTGCGCGTAGTAG-CCA
EARL CGGT-CGCGGGGCTCTTAAAATCAGTGGCGGCTGCCCGCCGGCCCTGCGCGTAGTAAACCA
MESP CGGCTCCCGGGGCTCTTAAAATCAGTGGCGGCGCCGGCCCGCCCTGCGCGTAGTAA-CT

```
101 TCC-TCGCGTCTGGGTCCGGCTGGTGTCTGCTGCCAGCAACCCCCC-----TTTCTCTCCAG
102 TCC-TCGCGTCTGGGTCCGGCTGGTGTCTGCTGCCAGCAACCCCCC-----TTTCTCTCCAG
104 TCC-TCGCGTCTGGGTCCGGCTGGTGTCTGCTGCCAGCAACCCCCC-----TTTCTCTCCAG
109 TCCCTCGCGTCTGGGTCCGGCTGGTGTCTGCTGCCAGCAACCCCCC-----TTTCTCTCCAG
114 TCC-TCGCGTCTGGGTCCGGCTGGTGTCTGCTGCCAGCAACCCCCC-----TTTCTCTCCAG
117 CCC-TCGCGTCTGGGTCCGGCTGGTGTCTGCTGCCAGCAACCCCCC-----TTTCTCTCCAG
118 TCC-TCGCGTCTGGGTCCGGCTGGTGTCTGCTGCCAGCAACCCCCC-----TTTCTCTCCAG
120 CCC-TCGCGTCTGGGTCCGGCTGGTGTCTGCTGCCAGCAACCCCCC-----TTTCTCTCCAG
121 TCC-TCGCGTCTGGGTCCGGCTGGTGTCTGCTGCCAGCAACCCCCC-----TTTCTCTCCAG
123 TCC-TCGCGTCTGGGTCCGGCTGGTGTCTGCTGCCAGCAACCCCCC-----TTTCTCTCCAG
MALI CCC-TCGCGTCTGGGTCCGGGCGGCGTCTGCTGCCAGCAACCCCCCCCCCACTTCCACACCG
EARL CCC-TCGCGTCTGGGTCCGGGCCGGTGTCCAGCCAGCCACCCCCC-----CTCTTTTACAG
MESP CCTCTCGCGTCTGGGTCCGTCGGCCGCTAGCTAGCAACCCCCC-----CTTTCTCG
      * ***** * * ** * ** ** ***** *
```

```
101 GTTGACCTCGG
102 GTTGACCTCGG
104 GTTGACCTCGG
109 GTTGACCTCGG
114 GTTGACCTCGG
117 GTTGACCTCGG
118 GTTGACCTCGG
120 GTTGACCTCGG
121 GTTGACCTCGG
123 GTTGACCTCGG
MALI GTTGACCTCGG
EARL GTTGACCTCGG
MESP GTTGACCTCGG
*****
```

Danksagung

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. T. Debener unter dessen Betreuung ich viel, insbesondere molekularbiologische Methoden, gelernt habe, sowie dem Institutsleiter des IZZ Prof. Dr. Grunewaldt.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, insbesondere bei Frau Matthiesch und Dr. Schulz, und allen anderen Institutsangehörigen bedanken.

Außerdem einen herzlichen Dank an die Forschungs-Kooperation der drei Firmen Rosen Kordes, Rosenwelt Tantau und Noack Rosen.

Insbesondere den Rosenzüchtern J. Wiegand, T. Unger und T. Proll bin ich zu herzlichem Dank verpflichtet.

Lebenslauf**Persönliche Angaben**

NAME: Oliver Blechert

GEBURTSDATUM: 2.11.1968

GEBURTSORT: Hamburg

Schulbildung

1975-1979: Silberbergschule in Geesthacht

1979-1989: Otto-Hahn-Gymnasium in Geesthacht

Berufsausbildung

1990-1993: Ausbildung zum KfZ-Mechaniker

Hochschulstudium

1993-2000: Studium an der Philipps-Universität in Marburg mit Abschluss als Diplombiologe

Doktorandenstudium

2000-2005: Doktorand am Institut für Zierpflanzenzüchtung der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen