

## Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLPs) der Nadelparasiten *Rhizosphaera* spp. und *Lophodermium* spp.

G. BAHNWEG\*, H. SANDERMANN, Jr.

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

E. M. MÖLLER, A. G. SCHILLING

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

Eingegangen am 4.12.1993

Bahnweg, G. et. al. (1994) – Restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) of the needle parasites *Rhizosphaera* spp. and *Lophodermium* spp. *Z. Mykol.* 60(1): 231–238.

**Key Words:** RFLP, rDNA, Southern hybridization, needle parasites, *Rhizosphaera*, *Lophodermium*

**Summary:** Total DNA of 20 isolates of *Rhizosphaera* and *Lophodermium* was prepared and subjected to restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. Restriction enzymes used were BglII and BglIII in combination with XbaI, XhoI, BamHI, EcoRV, EcoRI or HindIII. The DNA probe was plasmid pMY60 carrying a rDNA repeat unit of *Saccharomyces carlsbergensis* suitable for heterologous hybridization. These restriction enzyme/probe combinations revealed highly polymorphic rDNA fragments among *Lophodermium* isolates. Fragment patterns of *Rhizosphaera* isolates were rather uniform and thus permitted only identification of the genus rather than of species or strains.

**Zusammenfassung:** Die Gesamt-DNA von 20 Isolatzen der Gattungen *Rhizosphaera* und *Lophodermium* wurde einer Restriktionsfragment-Längenpolymorphismusanalyse (RFLP) unterworfen. Die Restriktionsenzyme BglII und BglIII kombiniert mit XbaI, XhoI, BamHI, EcoRV, EcoRI oder HindIII wurden verwendet. DNA-Sonde war das Plasmid pMY60 mit einem vollständigen rDNA-Repeat der Hefe *Saccharomyces carlsbergensis*, welche eine heterologe Hybridisierung gestattet. Diese Enzym/Sonden-Kombinationen zeigten hochpolymorphe rDNA-Fragmente bei *Lophodermium*-Isolatzen. Die Fragmentmuster der *Rhizosphaera*-Isolate dagegen waren ähnlich und erlaubten lediglich die Identifizierung der Gattung.

Molekulare Methoden zur Bearbeitung allgemeiner taxonomischer Fragen wie spezieller Probleme erfreuen sich zunehmender Beliebtheit auch in der Pilzkunde. Der Zugriff auf die Erbsubstanz, die DNA (Desoxyribonukleinsäure), eines Organismus bietet den unschätzbaren Vorteil, daß ihre Charakteristika unabhängig sind von äußeren Einflüssen wie Wachstumsbedingungen, Ernährungszustand und Alter oder anderen Faktoren. Weiterhin besitzen alle Organe eines Pilzes (Hyphen, Rhizomorphen, Fruchtkörper) identisches Erbmaterial ebenso wie die imperfekten und perfekten Stadien von Ascomyceten oder Basi-

\* Sonderdruckanforderungen an Dr. G. Bahnweg

diomyceten, so daß durch die Analyse der DNA einer beliebigen Probe eine Identifizierung erfolgen kann, ohne auf die Ausbildung von Strukturen angewiesen zu sein, die für eine makro- oder mikroskopische Bestimmung notwendig sind.

Von den verschiedenen Methoden der DNA-Analyse haben sich neben Sequenzierungsverfahren vor allem die RFLP-(Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus)-Analyse und die Anwendung der PCR (Polymerase-Kettenreaktion) in der Mykologie durchgesetzt. Die PCR-Methodik wird in dem Artikel von MÖLLER et al. (1994, dieses Heft) ausführlich erläutert. Der vorliegende Artikel beschränkt sich auf die RFLP-Analyse.

Wichtigstes Werkzeug der RFLP-Analyse sind Restriktionsendonucleasen (Restriktionsenzyme), die bestimmte Basensequenzen erkennen und DNA nur dann spalten, wenn ihre Erkennungssequenz in einer zu schneidenden DNA vorliegt. Restriktionsenzyme mit einer Erkennungssequenz von 6 Basenpaaren (bp) schneiden im statistischen Durchschnitt einmal pro 4096 bp – der größte Teil der gebildeten DNA-Fragmente ist zwischen 200 und 50 000 bp lang. Die durch Restriktionsenzyme produzierten DNA-Fragmente sind für eine DNA charakteristisch und können durch Agarose-Gelelektrophorese ihrer Länge entsprechend aufgetrennt werden. Mit Ethidiumbromid gefärbte DNA fluoresziert bei Anregung mit ultraviolettem Licht rot und kann so sichtbar gemacht werden (Abb. 1.). Sauber getrennt und vermessen werden können in einer üblichen Agarose-Gelelektrophorese Fragmente von 500 bis 15 000 bp. Diskrete DNA-Banden beobachtet man aber nur dann, wenn die Gesamtgröße der untersuchten DNA (des Genoms) klein ist, also z. B. der DNA von Bakteriophagen (z. B.  $\lambda$ , Abb. 1, Bahn 2) oder von Mitochondrien (z. B. des pflanzenpathogenen Oomyceten *Phytophthora parasitica*, Abb. 1, Bahn 3). Der Phage  $\lambda$  hat eine Genomgröße von ca. 49 000 bp, die Mitochondrien von *P. parasitica* von ca. 36 000 bp. Das Pilzgenom ist jedoch ca. 50–100 Millionen bp groß (das von höheren Pflanzen und Tieren noch einmal um den Faktor 100–1000 größer), so daß durch Spaltung mit Restriktionsenzymen eine große Zahl von DNA-Fragmenten aller möglichen Größen entsteht, die im Agarosegel den Eindruck einer „Schmiere“ vermitteln (Abb. 1., Bahn 1, Kern-DNA von *P. parasitica*). Allerdings sind in einer solchen „Schmiere“ oft auch einige besonders helle Banden zu sehen. Ursache hierfür ist DNA, die im Genom in vielfachen identischen Kopien, sog. „Repeats“, vorliegt.

In der RFLP-Analyse hat sich das Interesse vor allem auf solche repetitive DNA konzentriert, wie z. B. die extrachromosomale DNA der Mitochondrien (BRUNS et al. 1988, FÖRSTER et al. 1988, 1989, SMITH & ANDERSON 1989) oder die chromosomalen Gene für die ribosomale RNA (Ribonukleinsäure). Ribosomen sind die Eiweißfabriken einer jeden Zelle; ihr Rückgrat wird durch die ribosomale RNA (rRNA) gebildet. Kleines, großes und 5,8 S Gen der rRNA liegen geordnet auf einem DNA-Fragment von ca. 7000 bis 16 000 bp Länge, getrennt durch zwei interne Spacer und einer großen intergenischen Region (rDNA, Abb. 2). Das vierte rRNA Gen, die 5 S rRNA, liegt meist in der intergenischen Region separat von den drei erstgenannten Genen. Solch eine Einheit (rDNA-Repeat) liegt im Genom in 100 oder mehr (meist) identischen Kopien als Cluster vor, deren Einheiten „head to tail“ verbunden sind. Diese Art der Organisation der ribosomalen RNA Gene ist typisch für Pilze (zusammengefaßt bei GARBER et al. 1988) und den meisten anderen Eukaryonten. Bemerkenswert ist außerdem eine im großen rRNA-Gen vorhandene Bg1III-Schnittstelle (Abb. 2), die in fast allen Pilzen und anderen Eukaryonten zu finden ist (GARBER et al. 1988, De COCK, pers. Mitteilung).

Der Vorteil repetitiver DNA ist, daß geringe Ausgangsmengen an DNA für Analysen ausreichend sind. Mitochondriale DNA ist von der Kern-DNA durch ihre Lokalisation in Mitochondrien (von denen meist viele in einer Zelle vorkommen) und ihrer Basenzusam-

