

Lehrstuhl für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung
der Technischen Universität München

**Entwicklung und Validierung von molekularen
Markersystemen für QoI-Fungizidresistenzen
bei pilzlichen Phytopathogenen**

Stefan Bäuml

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. G. Forkmann

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. G. Wenzel

2. Univ.-Prof. Dr. W. Oßwald

Die Dissertation wurde am 17.03.2004 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 17.06.2004 angenommen.

Vorveröffentlichungen

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden folgende Artikel in wissenschaftlichen Fachzeitschriften publiziert:

BÄUMLER S, SIEROTZKI H, GISI U, MOHLER V, FELSENSTEIN FG, SCHWARZ G (2003). Evaluation of *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici* field isolates for resistance to strobilurin fungicides with different SNP detection systems. *Pest Manag Sci* **59**, 310-314

BÄUMLER S, FELSENSTEIN FG, SCHWARZ G (2003). CAPS and DHPLC Analysis of a Single Nucleotide Polymorphism in the Cytochrome *b* Gene Conferring Resistance to Strobilurins in Field Isolates of *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*. *J Phytopathol* **151**, 149-152

SCHWARZ G, BÄUMLER S, BLOCK A, FELSENSTEIN FG, WENZEL G (2004). Determination of detection and quantification limits for SNP allele frequency estimation in DNA pools using real time PCR. *Nucleic Acids Res* **32**, e24

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Die Bedeutung der Qol Fungizide	1
1.2	Biochemische Funktionsweise von Strobilurinen	2
1.3	Synthetische Qol Fungizide.....	3
1.4	Genetische Ursachen für Qol Resistenzen in pilzlichen Pathogenen.....	5
1.5	Mechanismen der mitochondrialen Vererbung bei Pilzen	7
1.6	Verbreitung von Qol Resistenzen	8
1.7	Molekulare Markersysteme für den Nachweis von Punktmutationen.....	10
2	MATERIAL UND METHODEN.....	18
2.1	Material	18
2.1.1	Verbrauchsmaterial und Chemikalien.....	18
2.1.2	Enzyme und Kits	19
2.1.3	PCR Oligonukleotide	20
2.1.4	Pilzmaterial.....	21
2.2	Methoden.....	22
2.2.1	Sammlung, Erhaltung und ' <i>In-vivo</i> ' Klassifizierung der Pathogenisolate ...	22
2.2.2	DNA Isolation	23
2.2.3	Herkunft der mitochondrialen Cytochrom <i>b</i> Nukleotidsequenzen.....	24
2.2.4	Rekombinante DNA Techniken	24
2.2.5	Sequenzanalyse.....	25
2.2.6	Einführung eines Nukleotidaustausches in ein PCR Amplikon.....	26
2.2.7	Allel-spezifische PCR	27
2.2.8	Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) Analyse	28
2.2.9	DHPLC Analyse	29
2.2.10	Quantitative allel-spezifische PCR Analyse.....	31

3	ERGEBNISSE	41
3.1	Molekulare Markersysteme für Qol-Resistenz bei	
	<i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>tritici</i>	41
3.1.1	CAPS-Analyse bei <i>B. graminis</i> f.sp. <i>tritici</i>	41
3.1.2	AS-PCR bei <i>B. graminis</i> f.sp. <i>tritici</i>	42
3.1.3	DHPLC Analyse bei <i>B. graminis</i> f.sp. <i>tritici</i>	44
3.2	Molekulare Markersysteme für Qol-Resistenz bei	
	<i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>hordei</i>	46
3.2.1	Sequenzanalyse bei <i>B. graminis</i> f.sp. <i>hordei</i>	46
3.2.2	CAPS-Analyse bei <i>B. graminis</i> f.sp. <i>hordei</i>	47
3.2.3	DHPLC-Analyse bei <i>B. graminis</i> f.sp. <i>hordei</i>	47
3.3	Molekulare Markersysteme für Qol-Resistenz bei <i>Venturia inaequalis</i> ...	48
3.3.1	CAPS-Analyse bei <i>V. inaequalis</i>	48
3.3.2	DHPLC-Analyse bei <i>V. inaequalis</i>	49
3.4	Molekulare Markersysteme für Qol-Resistenz bei <i>Septoria tritici</i>	50
3.4.1	DHPLC-Analyse bei <i>S. tritici</i>	52
3.5	Molekulare Markersysteme für Qol-Resistenz bei <i>Plasmopara viticola</i> ...	53
3.5.1	DHPLC-Analyse bei <i>P. viticola</i>	53
3.5.2	Quantitative allel-spezifische PCR bei <i>P. viticola</i>	54
4	DISKUSSION	62
4.1	Molekulare Grundlagen von Fungizidresistenzen	62
4.2	Molekulare Marker für Fungizidresistenzen	65
4.3	Validierung einer molekularen Resistenzdiagnostik	72
4.4	Einsatzmöglichkeiten molekularer Diagnosesysteme innerhalb eines	
	Fungizidresistenz Monitorings	80
5	ZUSAMMENFASSUNG	86
6	LITERATURVERZEICHNIS	88

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Auf dem Markt verfügbare QoI Fungizide	3
Tabelle 2:	Chemische Einteilung von QoI Fungiziden	5
Tabelle 3:	Chemikalien und Agenzien	18
Tabelle 4:	Enzyme	19
Tabelle 5:	Kits	20
Tabelle 6:	Oligonukleotide	20
Tabelle 7:	Pilzliche Cytochrom <i>b</i> Nukleotidsequenzen der EMBL-Gendatenbank	24
Tabelle 8:	Parameter der Site Directed Mutagenesis	27
Tabelle 9:	Parameter der allel-spezifischen PCR Analyse	28
Tabelle 10:	Parameter der CAPS Analyse	29
Tabelle 11:	Parameter der DHPLC PCR	30
Tabelle 12:	Universal Gradient zur Heteroduplexanalyse mit der Varian Helix™ Chromatographie Säule	31
Tabelle 13:	Pipettierschema zur Herstellung von Kalibrationsstandards für die qPCR Analyse	32
Tabelle 14:	Parameter der qPCR für das ARMS- und das Referenzsystem bei <i>Plasmopara viticola</i>	35
Tabelle 15:	Regressionsparameter und relative Effizienzen beim Vergleich von genomischen und klonierten Verdünnungsreihen	59
Tabelle 16:	Übersicht über die relativen Vertrauensbereiche sowie die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze der quantitativen allel- spezifischen PCR Analyse zur Detektion resistenter Allele in Feldmischproben von <i>Plasmopara viticola</i>	60
Tabelle 17:	Übersicht über Fungizidklassen, Resistenzmechanismen und molekulare Detektionsmethoden	66
Tabelle 18:	Übersicht über die relativen Nachweiskontexten resistenter Allele in Feldmischproben mit molekularen Diagnosetechniken	78

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Chemische Struktur von natürlich vorkommenden Qo Inhibitoren....	2
Abbildung 2:	Chemische Struktur von QoI Fungiziden: Strobilurine, Famoxadone und Fenamidone.....	4
Abbildung 3:	Ausschnitt aus der Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenz des Cytochrom <i>b</i> Gens eines sensitiven und eines resistenten Isolates von <i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>tritici</i>	6
Abbildung 4:	Schematische Darstellung des Funktionsprinzips eines CAPS Markers.....	11
Abbildung 5:	Schematische Darstellung des Funktionsprinzips einer allel-spezifischen PCR.....	11
Abbildung 6:	Schematische Darstellung des Funktionsprinzips einer Primer Extension	13
Abbildung 7:	Schematische Darstellung des Funktionsprinzips eines SSCP Markers.....	13
Abbildung 8:	Schematische Darstellung des Funktionsprinzips einer DHPLC Analyse.....	15
Abbildung 9:	Schematische Darstellung des Funktionsprinzips einer allel-spezifischen Hybridisierung	15
Abbildung 10:	Schematische Darstellung der ARMS-MAMA Technik zur Diskriminierung der G143A SNP Allele bei <i>Plasmopara viticola</i>	34
Abbildung 11:	Schematische Darstellung des CAPS Markers (14f+3r)/ <i>Ital</i> zur Detektion der G143A Mutation bei <i>B. graminis</i> f.sp. <i>tritici</i> und <i>B. graminis</i> f.sp. <i>hordei</i>	41
Abbildung 12:	<i>Ital</i> CAPS Marker zur Detektion der G143A Mutation bei <i>B. graminis</i> f.sp. <i>tritici</i>	42
Abbildung 13:	Schematische Darstellung des allel-spezifischen PCR Markers 14f+3r+Sf bzw 14f+3r+Rf zur Detektion der G143A Mutation bei <i>B. graminis</i> f.sp. <i>tritici</i>	43
Abbildung 14:	Allel-spezifische Amplifikation aus dem Cytochrom <i>b</i> Gen von <i>B. graminis</i> f.sp. <i>tritici</i>	43
Abbildung 15:	<i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>tritici</i> : Ermittlung der Detektionsgrenze resistenter Allele bei der DHPLC Analyse	45
Abbildung 16:	<i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>hordei</i> : Ermittlung der Detektionsgrenze resistenter Allele bei der DHPLC Analyse	45

Abbildung 17:	Alignment einer Teilsequenz des Cytochrom <i>b</i> Gens von <i>B. graminis</i> f.sp. <i>tritici</i> und <i>B. graminis</i> f.sp. <i>hordei</i>	46
Abbildung 18:	CAPS Marker zur Detektion der G143A Mutation bei <i>Venturia inaequalis</i>	49
Abbildung 19:	<i>Venturia inaequalis</i> : Ermittlung der Detektionsgrenze resistenter Allele bei der DHPLC Analyse	51
Abbildung 20:	<i>Septoria tritici</i> : Ermittlung der Detektionsgrenze resistenter Allele bei der DHPLC Analyse	51
Abbildung 21:	Differenzierung QoI resistenter und sensitiver <i>Plasmopara viticola</i> Isolate mit der DHPLC Analyse	54
Abbildung 22:	Amplifikationsplots des ARMS und Referenz PCR Systems bei einer Verdünnungsreihe resistenter genomischer DNA mit Wasser und die Parameter der linearen Regression der Ct-Werte gegen den Log der relativen Konzentration resistenter Allele	55
Abbildung 23:	Amplifikationsplots des ARMS und Referenz PCR Systems bei einer Verdünnungsreihe resistenter in sensitiver genomischer DNA und die Parameter der linearen Regression der Δ Ct-Werte gegen den Log der relativen Konzentration resistenter Allele	57

Abkürzungsverzeichnis

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
APEX	Arrayed Primer Extension
APS	Ammoniumpersulfat
ARMS	Amplification Refractory Mutation System
AS PCR	Allel-spezifische PCR
ATP	Adenosintriphosphat
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
CCD	Charge-Coupled Device
cDNA	copy DNA
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DHPLC	Denaturing High Performance Liquid Chromatography
DMI	Demethylierungshemmstoff
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EBI	Ergosterol-Biosynthesehemmstoff
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EtBr	Ethidiumbromid
FRAC	Fungicide Resistance Action Comittee
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
krist.	kristallin
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight
MAMA	Mismatch Amplification Mutation Assay
MBC	Benzimidazolfungizide
NaAc	Natriumacetat
PCR	Polymerase Chain Reaction
PVP	Polyvinylpyrrolidon
QoI	Qo Inhibitor
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonukleinsäure

Rnase	Ribonuklease
ROX	6-Carboxy-X-rhodamin
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SnuPE	Single Nucleotide Primer Extension
SSCP	Single Stranded Conformation Polymorphism
STAR	Strobilurin-Type Action And Resistance
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEMED	N,N,N',N' Tetramethylethylendiamin
Tris	2-Amino-2(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
X-GAL	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

1 Einleitung

1.1 Die Bedeutung der QoI Fungizide

Strobilurine und einige chemisch nicht verwandte Fungizide der selben Kreuzresistenzgruppe werden im Allgemeinen als Qo Inhibitoren (QoI Fungizide) bezeichnet. Das 'Fungicide Resistance Action Committee' (FRAC; www.frac.info) kennzeichnet diese Gruppe als 'Strobilurin-Type Action And Resistance' (STAR) Fungizide.

QoI Fungizide sind heutzutage entscheidender Bestandteil in den Pflanzenschutzprogrammen bei einer Fülle von Kulturpflanzen auf der ganzen Welt. Wichtige Einsatzgebiete liegen in der Bekämpfung von pilzlichen Krankheitserregern an Getreide, Wein, Kartoffeln, Früchte, Gemüse, Nüssen und Gräsern. Den großen Einfluss dieser Gruppe von Pflanzenschutzmitteln auf die Agrarproduktion spiegelt der aktuelle wirtschaftliche Status des Azoxystrobins wieder. Dieses Produkt verfügt über eine Zulassung bei insgesamt 84 unterschiedlichen Nutzpflanzen in 72 Staaten. Dabei sind über 400 Wirt/Pathogen Systeme betroffen.

Für den enormen Erfolg dieser Wirkstoffgruppe sind viele Faktoren verantwortlich. Mit QoI Fungiziden wird bei einer Kulturpflanze meist ein sehr breites Spektrum an Pathogenen erfasst. Außerdem ist damit eine effektive Bekämpfung von pilzlichen Phytopathogenen möglich, die eine ausgeprägte Resistenz gegenüber den bereits jahrelang eingesetzten Fungiziden aufweisen. QoI Fungizide versprechen hohe Ertrags- und Qualitätseigenschaften bei geringen Aufwandsmengen. In Pflanzenschutzprogrammen von einigen Kulturpflanzen haben die QoI Fungizide zu erheblichen Umgestaltungen geführt. So steht im Weinbau erstmals ein Mittel zur Verfügung, das sowohl zur Bekämpfung von Echten als auch von Falschen Mehltauerregern genutzt werden kann. Neben dem Einsatz zur Blattapplikation werden QoI Fungizide auch als Beizmittel gegen bodenbürtige Krankheitserreger eingesetzt. Beim Einsatz der QoI Fungizide im Getreidebau wird neben den fungiziden Eigenschaften ein sogenannter 'Greening Effekt' beobachtet. Die Pflanze wird veranlasst, die grünen Blattflächen länger zu erhalten, die Kornfüllungsphase zu verlängern und somit den Ertrag zusätzlich zu steigern.

Durch den Verkauf von QoI Fungiziden wurden bereits im Jahre 1999 weltweit zirka 620 Millionen US Dollar umgesetzt (McDOUGALL 2001). Dies entspricht mehr als 10% des globalen Fungizidmarkts nach nur vier Jahren seit Verkaufsbeginn. Alleine mit

dem Strobilurinfungizid Azoxystrobin wurde 1999 ein Umsatz von 415 Millionen US Dollar erzielt. Nach wie vor ist dieses Produkt das meistverkaufte Fungizid auf dem Weltmarkt.

1.2 Biochemische Funktionsweise von Strobilurinen

Die Strobilurin Fungizide gehen auf eine Gruppe natürlich vorkommender fungizider Substanzen zurück. Dazu gehören Strobilurin A und B, Oudemansin und Myxothiazol A (**Abbildung 1**). Diese Strobilurine werden von diversen Basidiomyceten wie *Oudemansiella mucida*, *Mycena galopoda* und *Strobilurus tenacellus* produziert, welche auf verrottendem Holz anzutreffen sind bzw. im Falle des Myxothiazol A aus dem Bakterium *Myxococcus fulvus* stammen.

Alle natürlich vorkommenden Qo Inhibitoren sind Derivate der β -Methoxy-Acrylsäure. Sie besitzen einen einzigen Wirkungsort innerhalb des Enzymsystems der mitochondrialen Atmungskette. Qo Inhibitoren blockieren die Zellatmung indem sie an die sogenannte Qo Seite des Cytochrom *bc1* Enzymkomplexes binden, welche an der inneren mitochondrialen Membran bei Pilzen und

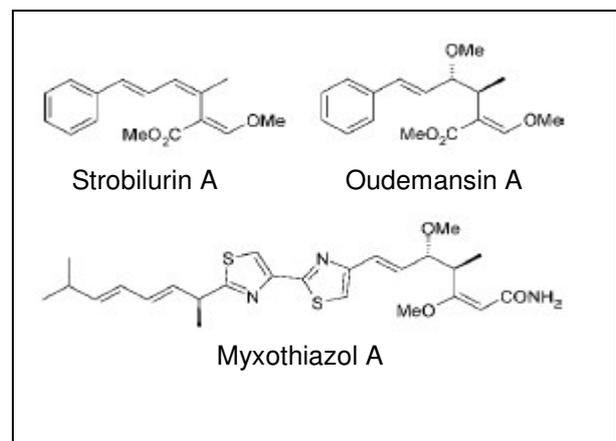


Abbildung 1: Chemische Struktur von natürlich vorkommenden Qo Inhibitoren

anderen eukaryontischen Zellen zu finden ist. Wenn ein Inhibitor bindet, wird der Elektronenfluss zwischen dem Cytochrom *b* und dem Cytochrom *c*₁ blockiert. Der Elektronentransport in der gesamten Atmungskette wird dadurch unterbrochen und die Zelle gerät in Energiemangel, da nicht mehr ausreichend ATP synthetisiert werden kann (ANKE et al. 1977; BECKER et al. 1981; VON JAGOW et al. 1986). Qo Inhibitoren zeigen keinerlei Kreuzresistenz gegenüber Substanzen wie Antimycin (DEGLI ESPOSTI et al. 1993; SIEROTZKI et al. 2000b) und das Cyanoimidazol IKF 916 (MITANI et al. 1998), die durch Bindung an die sogenannte Qi Seite des Cytochrom *bc1* Komplexes die Zellatmung stören.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass in der pilzlichen Entwicklung vor allem die energieaufwendigen Stadien der Sporenkeimung und des Zoosporenschlupfes be-

sonders sensitiv auf QoI Wirkstoffe reagieren (GODWIN et al. 1994, 1997; LEINHOS et al. 1997). Der entscheidende Einfluss auf diese Entwicklungsstadien erklärt die ausgezeichnete präventive Wirkung dieser Fungizidgruppe.

1.3 Synthetische QoI Fungizide

Natürliche Strobilurine degenerieren unter UV Einfluss sehr schnell und sind deshalb für einen Einsatz im Pflanzenschutz nicht geeignet. Bei der Entwicklung der Strobilurinfungizide wurden deshalb eine Reihe chemischer Modifikationen durchgeführt, um das pilzliche Wachstum unter Praxisbedingungen zuverlässig unterdrücken zu können. Der neue Wirkstoff soll spezifisch nur bei Pilzen wirken, wohingegen einige natürlich vorkommende Strobilurine zum Teil hohe Toxizität gegenüber andere Organismen aufweisen (GERTH et al. 1980; VONDRÁČEK et al. 1967). Zwei unabhängige Forschungsprogramme der BASF AG und der ZENECA AGRO LTD. führten schließlich nach mehreren Jahren Entwicklungszeit zu den ersten synthetischen Strobilurinen. Als Folge dieser beiden Programme wurde im Jahre 1996 von der ZENECA AGRO LTD. das Azoxystrobin (GODWIN et al. 1992; CLOUGH et al. 1998) und von der BASF AG das Kresoxim-methyl (AMMERMANN et al 1992; SAUTER et al. 1999) auf den Fungizidmarkt eingeführt (**Tabelle 1**). Die beiden Wirkstoffe wurden mit nur zwei Tagen Unterschied zum Patent angemeldet.

Tabelle 1: Auf dem Markt verfügbare QoI Fungizide

Wirkstoff	Unternehmen	Markteinführung
Azoxystrobin ¹	SYNGENTA	1996
Kresoxym-methyl	BASF	1996
Famoxadone	DUPONT	1997
Metominostrobin	SHIONOGI	1999
Trifloxystrobin ²	BAYER	1999
Fenamidone ³	AVENTIS	2001
Picoxystrobin	SYNGENTA	2002
Pyraclostrobin	BASF	2002

¹Entwickelt von ZENECA Agro, jetzt Syngenta; ²Entwickelt von Novartis, in 2000 verkauft an Bayer CropScience; ³Entwickelt von RhonePoulenc, jetzt Aventis

Unabhängig von den beiden europäischen Forschungsprogrammen entwickelte SHIONOGI INC. ein weiteres Strobilurinfungizid Metominostrobin und brachte dieses im Jahre 1999 auf den Markt (HAYASE et al. 1995).

Im Laufe der folgenden Jahre wurden weitere Strobilurinfungizide entwickelt. NOVARTIS präsentierte 1999 das Trifloxystrobin (MARGOT et al. 1998) und verkaufte dieses 2000 im Zuge der Fusion von NOVARTIS AGRIBUSINESS und ZENECA AGRO LTD. an BAYER CROPSCIENCE. Zwei Jahre später erschienen Picoxystrobin (GODWIN et al. 2000) und Pyraclostrobin (AMMERMANN et al. 2000) von SYNGENTA bzw. BASF AG. Neben diesen sechs Strobilurinen verlief parallel die Entwicklung von weiteren Wirkstoffen, die ebenfalls an die Qo Stelle des Cytochrom *b* binden (QoI Fungizide) aber strukturell verschieden zu den Strobilurinen sind. Wirtschaftliche Bedeutung erlangt haben dabei die beiden synthetischen Fungizide Famoxadone (JOSHI et al. 1996; STERNBERG et al. 2001) und Fenamidone (MERCER et al. 1998) von DUPONT bzw. AVENTIS.

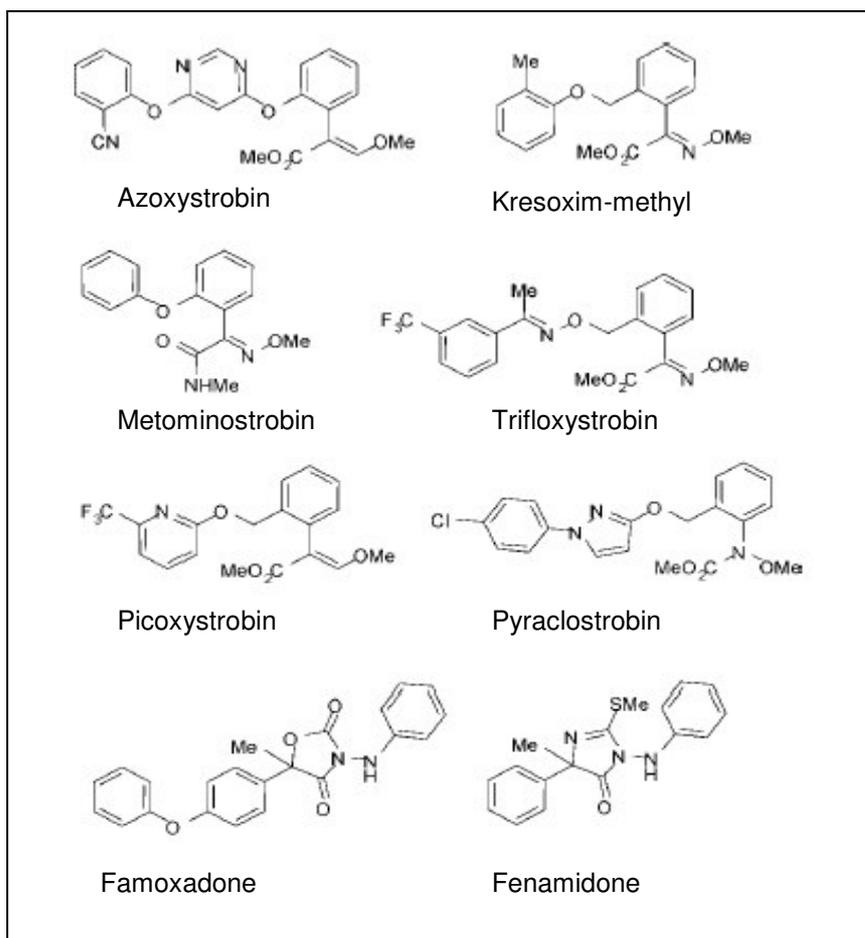


Abbildung 2: Chemische Struktur von QoI Fungiziden: Strobilurine, Famoxadone und Fenamidone

Detaillierte Studien mit Famoxadone haben gezeigt, dass dieser Wirkstoff nicht an der selben Stelle wie das Myxothiazol bindet aber dass sich deren beiden Bindungsstellen überlappen (JORDAN et al. 1999). Basierend auf strukturellen Ähnlichkeiten können die Qols in sieben Klassen eingeteilt werden (**Tabelle 2**). Alle diese Klassen zeigen in '*in planta*' Tests bei der Sporenkeimung, im Mycelwachstum, bei zellfreien Enzymtests und bei artifiziellen Mutanten Kreuzresistenz (HEANY et al. 2000; JORDAN et al. 1999; SIEROTZKI et al. 2000a; CHIN et al. 2000). Dennoch ist das Wirkungsspektrum der auf dem Markt erhältlichen Qol Fungizide gegenüber unterschiedliche pilzliche Phytopathogene oft sehr verschieden (SIEGFRIED & HOLLINGER 1998; MCNAB 1999; ANONYM 2001; GISI 2002). Gleichermaßen unterscheiden sich die Produkte stark in ihrem Verhalten bei der Aufnahme in die Pflanze und der Umverteilung des Wirkstoffs auf und innerhalb der Pflanze (AMMERMANN et al. 1992; MASUKO et al. 1993; MARGOT et al. 1998; GODWIN et al. 1999; GODWIN et al. 2000; REUVINI 2001).

Tabelle 2: Chemische Einteilung von Qol Fungiziden

	Klassenbezeichnung	Wirkstoffe
I	Methoxyacrylate	natürlich vorkommende Stoffe wie Strobilurin A und B, Azoxystrobin, Picoxystrobin
II	Methoxycarbamate	Pyraclostrobin (BAS 500)
III	Oximinoacetate	Kresoxym-Methyl, Trifloxystrobin
IV	Oximinoacetamide	Metominostrobin (SSF 126)
V	Oxazolidinedione	Famoxadone
VI	Imidazolinone	Fenamidone (RPA 407213)
VII	Antibiotika	Myxothiazol

1.4 Genetische Ursachen für Qol Resistenzen in pilzlichen Pathogenen

Das Cytochrom *b* Protein wird kodiert vom Cytochrom *b* Gen (*cyt b*), welches im mitochondrialen Genom aller Eukaryonten lokalisiert ist. Von manchen Organismen sind Mutanten bekannt, die gegenüber Qo Inhibitoren resistent reagieren (BRASSEUR et al. 1996). Dazu gehören neben Bakterien und Pilzen auch einige Algen, Protozoen und Tiere (DI RAGO et al. 1989; DEGLI ESPOSTI et al. 1993). Bei verschiedenen Organismen sind Punktmutationen (SNPs) in zwei Regionen des Cytochrom *b* Gens beschrieben worden, welche zum Austausch von Aminosäuren im Bereich der Positionen 127-147 und 275-296 führen. Diese Aminosäuren liegen alle nahe der Qo Positi-

on des Cytochrom *b* Proteins (GEIER et al. 1992; JORDAN et al. 1999). Besondere Bedeutung haben Mutationen, die zum Austausch von Phenylalanin durch Leucin auf Position 129 (F129L), bzw. von Glycin durch Alanin auf Position 143 (G143A) führen, da sie ein hohes Maß an QoI Resistenz verleihen ohne dem Organismus einen Nachteil auf die Fitness mitzubringen (BRASSEUR et al. 1996).

Ausschnitt aus der Nukleotidsequenz

sensitiv: ... **ACTGGGGT**GCAACCG ...

resistent: ... **ACTGGGGCT**GCAACCG ...

Codon für Glycin
bzw. Alanin

Ausschnitt aus der Aminosäuresequenz

sensitiv: ... **SHWG**ATVIT ...

resistent: ... **SHWA**ATVIT ...

143

Abbildung 3: Ausschnitt aus der Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenz des Cytochrom *b* Gens eines sensitiven und eines resistenten Isolates von *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*

Sequenzanalysen des Cytochrom *b* Gens wurden bisher nur bei einer eingeschränkten Zahl an pilzlichen Phytopathogenen durchgeführt. Das Cytochrom *b* Gen von *Venturia inaequalis* ist 10.656 Basenpaare groß und besitzt sieben Exons und sechs Introns (ZHENG & KÖLLER 1997). Dieses Gen ist bei *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* mit insgesamt 1140 bp (SIEROTZKI et al. 2000a), bei *Plasmopara viticola* mit 1200 bp (SIEROTZKI & GISI 2002) und bei *Mycosphaerella fijiensis* mit 2036 bp (SIEROTZKI et al. 2000b) wesentlich kleiner. *Mycosphaerella fijiensis* besitzt nur ein, *B. graminis* f.sp. *tritici* und *Plasmopara viticola* jeweils kein Intron.

Durch eine Studie mit *Mycosphaerella fijiensis* konnte funktionell bewiesen werden, dass die G143A Mutation im Cytochrom *b* Gen für die Resistenzausprägung verantwortlich ist. Dabei wurden *Mycosphaerella fijiensis* Protoplasten von QoI sensitiven Feldisolaten mit einem PCR Amplikon aus dem Cytochrom *b* Gen eines resistenten Feldisolates transformiert. Diese Transformation resultierte schließlich in der Ausprägung vollständiger phänotypischen Resistenz gegenüber QoI Fungizide (SIEROTZKI et al. 2002).

Die ersten QoI resistenten Feldisolate eines pilzlichen Phytopathogens wurden 1998 bei *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* in Norddeutschland identifiziert (FELSENSTEIN 1999). Inzwischen wird auch bei weiteren Pathogenen vermehrt QoI Resistenz beobachtet. In den allermeisten Fällen wird die Resistenzausprägung durch den Aminosäurenaustausch G143A im Cytochrom *b* Gen verursacht. Die verantwortliche Punktmutation wurde bisher identifiziert bei *B. graminis* f.sp. *tritici*, *B. graminis* f.sp. *hordei*, *Plasmopara viticola*, *Pseudoperonospora cubensis*, *Mycosphaerella fijiensis*, *Sphaerotheca fuliginea*, *Pyricularia grisea* und *Didymella bryoniae* (HEANY et al. 2000; SIEROTZKI et al. 2000a & 2000b). All diesen Pathogenen verleiht die G143A Mutation hochgradige Resistenz gegenüber QoI Inhibitoren (GISI et al. 2002).

Bei resistenten Feldisolaten von *Venturia inaequalis* konnte ebenfalls die G143A Mutation beobachtet werden. Darüber hinaus sind bei diesem Pathogen Isolate bekannt, die eine wesentlich weniger effektive Form von QoI Resistenz zeigen, bei denen aber keine Mutation im Cytochrom *b* Gen identifiziert werden konnte (OLAYA et al. 1998). Eine bisher nicht näher beschriebene metabolische Aktivität von *Venturia inaequalis* wird hierfür verantwortlich gemacht (STEINFELD et al. 2002). Neben der G143A Mutation wurde bei den pilzlichen Phytopathogenen *Pyricularia grisea* und *Phytium aphanidermatum*, beides sehr bedeutende Krankheitserreger an Gräsern, eine weitere Punktmutation im Cytochrom *b* Gen identifiziert. Diese Mutation ist verantwortlich für den Aminosäurenaustausch Phenylalanin durch Leucin auf Position 129 (F129L), wodurch Resistenz gegenüber QoI Inhibitoren verursacht wird (FARMAN 2001). Die F129L Mutation wird zunehmend auch in Feldproben von *Plasmopara viticola* beobachtet (WILLE et al. 2002).

1.5 Mechanismen der mitochondrialen Vererbung bei Pilzen

Resistenzen gegenüber QoI Fungizide in pilzlichen Phytopathogenen werden durch das mitochondriale Cytochrom *b* Gen vererbt. Bei Säugetieren und höheren Pflanzen werden Mitochondrien in erster Linie ausschließlich von der Mutter, also uniparental, an die Nachkommen weitergegeben. Spezies mit einem biparentalen Modus der mitochondrialen Vererbung von väterlichen und mütterlichen Mitochondrien sind sehr selten. Diesen Vererbungstyp kann man bei Grillen (HARRISON et al. 1985) und *Drosophila mauritiana* (SOLIGNAC et al. 1983) beobachten. Bei *Physarium polycephalum* aus der Abteilung der Schleimpilze (*Myxomycota*) ist sowohl ein uniparentaler als

auch ein biparentaler Modus der mitochondrialen Vererbung bekannt. Verantwortlich dafür ist der multiallelische Mating Type Locus *matA* (TAKANO 2000). In Hyphomyzeten wird das mitochondriale Genom uniparental vererbt (RÖHR et al. 1999). In manchen pilzlichen Organismen, wie bei den heterothallischen *Neurospora* Spezies werden Mitochondrien anisogam immer von der mütterlichen Seite vererbt, unabhängig davon ob eine Hyphenfusion oder eine Befruchtung einer Trychogyne mit einer Konidiospore erfolgt (GRIFFITHS 1996). Eine weitere Alternative stellen isogame hermaphroditische Vererbungsmechanismen dar, bei denen jeder der beiden Kreuzungseltern als mütterlicher Mitochondrien-Donor fungieren kann. Jeder der Nachkommen besitzt demnach Mitochondrien ausschließlich von einem der beiden Kreuzungseltern. Diese Art der Vererbung wurde vor allem bei Vertretern der Homobasidiomyceten, wie *Schizophyllum commune* (SPECHT et al. 1992) beobachtet. Eine isogame hermaphroditische mitochondriale Vererbung findet man auch bei dem Ascomyceten *Aspergillus nidulans* (COENEN et al. 1996).

Die Mechanismen der mitochondrialen Vererbung sind bei phytopathogenen Pilzen kaum näher erforscht worden. ROBINSON et al. (2002) konnten bei *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* eine isogame hermaphroditische mitochondriale Vererbung nachweisen. Bei dieser Studie wurden QoI sensitive und QoI resistente Isolate als Kreuzungseltern verwendet und die G143A Mutation als Marker für den Vererbungstyp benutzt. Alle Nachkommen dieser Kreuzung zeigten entsprechend den Kreuzungseltern entweder vollständige Sensitivität oder Resistenz gegenüber QoI Fungizide. Jedes elterliche Isolat kann bei *B. graminis* f.sp. *tritici* als mütterliche Linie und dementsprechend als Mitochondrien-Donor dienen. ROBINSON et al. (2002) wiesen auf die Möglichkeit hin, dass dennoch einzelne Isolate einen sehr großen Anteil an Mitochondrien von einem und einen sehr viel kleineren vom jeweils anderen Kreuzungselter erben können. Solche heteroplasmatische mitochondriale Mischtypen konnten bisher nicht identifiziert werden. Heteroplasmatische Isolate würden einen tieferen Einblick in die Evolution der QoI Resistenz in pilzlichen Pathogenpopulation erlauben.

1.6 Verbreitung von QoI Resistenzen

Der Einfluss der QoI Resistenz auf den Fungizideinsatz im Getreideanbau war bisher auf den Mehltau an Weizen und Gerste, *B. graminis* f.sp. *tritici* bzw. f.sp. *hordei*, beschränkt (HEANY et al. 2000; CHIN et al. 2001). Seit der Entdeckung der ersten resis-

tenten Isolate im Jahr 1998 (FELSENSTEIN 1999) hat sich die QoI Resistenz bei *B. graminis* f.sp. *tritici* über ganz Nordeuropa ausgebreitet. Im Gegensatz dazu wurde die 1999 entdeckte QoI Resistenz bei *B. graminis* f.sp. *hordei* bisher nur an vereinzelten Stellen in Europa beobachtet. Trotz intensiver Resistenzuntersuchungen wurde bisher bei *Rynchosporium secalis*, *Helminthosporium teres* und *Puccinia recondita* keine Form von QoI Resistenz gefunden (GEHMANN et al. 2003).

Die Ausbreitung der QoI Resistenz beim Echten Mehltau an Gurkengewächsen, *Sphaerotheca fuliginea*, betrifft bisher Asien und Teile Südeuropas. Mit Ausnahme Brasiliens wurde bei diesem Pathogen noch keine Resistenz in Südamerika und den USA entdeckt. Eine ähnliche Verbreitung der Resistenz in Asien aber nicht in Europa und den USA beobachtet man beim Falschen Mehltau an Gurkengewächsen, *Pseudoperonospora cubensis* (HEANY et al. 2000). Die Gründe für diese regionalen Differenzen sind unklar. Ferner konnte eine örtlich vermehrt auftretende QoI Resistenz bei der Schwarzfäule an Gurkengewächsen, *Didymella bryoniae*, in den USA beobachtet werden (GEHMANN et al. 2003).

QoI Resistenz beim Falschen Mehltau am Wein, *Plasmopara viticola*, wurde zuerst 1999 in drei unterschiedlichen Versuchsfeldern in Italien und Frankreich diagnostiziert (HEANY et al. 2000; GISI et al. 2000). Untersuchungen an *Plasmopara viticola* Populationen in 2001 und 2002 ergaben ein sehr uneinheitliches Bild bezüglich der Verbreitung der QoI Resistenz in Europa. Ein hoher Anteil resistenter Isolate wurde in der Emilia Romagna und einigen anderen Regionen Italiens und in manchen Teilen Frankreichs gefunden. In Spanien, Portugal und Deutschland konnten bisher keine resistenten Isolate identifiziert werden. Obwohl auch beim Echten Mehltau, *Uncinula necator*, umfangreiche Resistenzuntersuchungen durchgeführt werden, konnte bei diesem Pathogen bisher kein QoI resistentes Isolat identifiziert werden (GEHMANN et al. 2003).

Beim Apfelschorf, *Venturia inaequalis*, wurde QoI Resistenz bisher bei Isolaten aus Norddeutschland, Norditalien und Westpolen beobachtet. Daneben hat man in verschiedenen anderen Regionen Europas Isolate mit einer leicht verminderten QoI Sensitivität entdeckt, die aber keine Punktmutation im Cytochrom *b* Gen besitzen. Die genetischen Hintergründe dieser schwächer ausgeprägten metabolischen Resistenz konnten bisher nicht aufgedeckt werden (GEHMANN et al. 2003).

Ein großer Anteil QoI resistenter Isolate der 'Black Sigatoka' Krankheit, *Mycosphaella fijiensis*, mit der G143A Mutation wurde in einigen Plantagen der Hauptanbauregion für Bananen in Costa Rica identifiziert (SIEROTZKI & GISI 2002). Im Gegensatz dazu konnte bisher in allen anderen Bananen produzierenden Ländern keine besonders starke Verbreitung dieser Resistenz beobachtet werden (GEHMANN et al. 2003).

1.7 Molekulare Markersysteme für den Nachweis von Punktmutationen

Variationen innerhalb eines DNA Abschnitts an nur einer Nukleotidposition werden als 'Single Nucleotide Polymorphisms' (SNPs) bezeichnet. SNPs sind meist bi-allel (Wildtyp/Mutante) und werden sehr stabil vererbt. Sie sind die meistverbreitetste Form von DNA Polymorphismen und deshalb auch für umfangreiche Genotypisierungsprojekte sehr gut geeignet. Im menschlichen Genom treten SNPs alle 100-300 Basen auf (WANG et al. 1998). Informationen über die Frequenz von SNPs in pflanzlichen und pilzlichen Genomen sind bisher kaum vorhanden. Zwischen zwei Ökotypen vom Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* wurde über das gesamte Genom verteilt eine Kollektion von 37344 SNPs dokumentiert. Dies entspricht einem SNP pro 3,3 kb DNA Sequenz (www.arabidopsis.org/cereon/).

Sehr viele der bisher identifizierten Resistenzmechanismen an pilzlichen Phytopathogenen werden durch Punktmutationen in der Nukleotidsequenz des Fungizid-Zielproteins verursacht. Im Falle der QoI Resistenz durch den G143A Aminosäureaustausch im Cytochrom *b* Protein, genügt ein einziger SNP um einem Organismus ein ausgesprochen hohes Maß an Fungizidresistenz zu verleihen. Bei der Detektion von Fungizidresistenzen mit molekularen Markersystemen besitzen SNP Diagnosesysteme deshalb eine herausragende Bedeutung.

Eine sehr weit verbreitete SNP Detektionstechnik ist der PCR-RFLP. Diese Methode wird oft auch als 'Cleaved Amplified Polymorphic Sequence' (CAPS; KONIECZNY & AUSUBEL 1993) bezeichnet. Ein DNA Fragment, welches die SNP Region umspannt, wird zunächst in einer PCR amplifiziert. Anschließend wird dieses Amplikon mit einer Restriktionsendonuklease inkubiert, die nur bei Anwesenheit von einem der beiden SNP Allele ihre spezifische Erkennungssequenz vorfindet und den DNA Strang hydrolysiert (**Abbildung 4**). Nach Auftrennung der Fragmente auf einem Agarosegel kann eine Genotypisierung anhand der Fragmentgrößen durchgeführt werden. Auf-

grund des einfachen Funktionsprinzips wird dieser Markertyp noch immer in sehr vielen Genotypisierungsprojekten verwendet. Die CAPS Analyse erfordert relativ aufwendige Arbeitsschritte nach der eigentlichen PCR Amplifikation. Eine computergestützte Auswertung ist nur schlecht möglich. Dieser Markertyp ist deshalb nicht als Analysenverfahren für große Probenmengen geeignet.

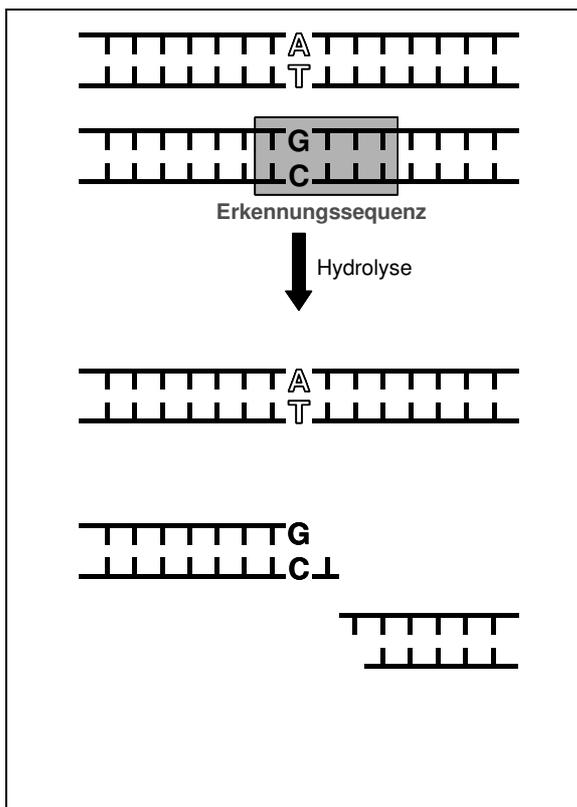


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips eines CAPS Markers

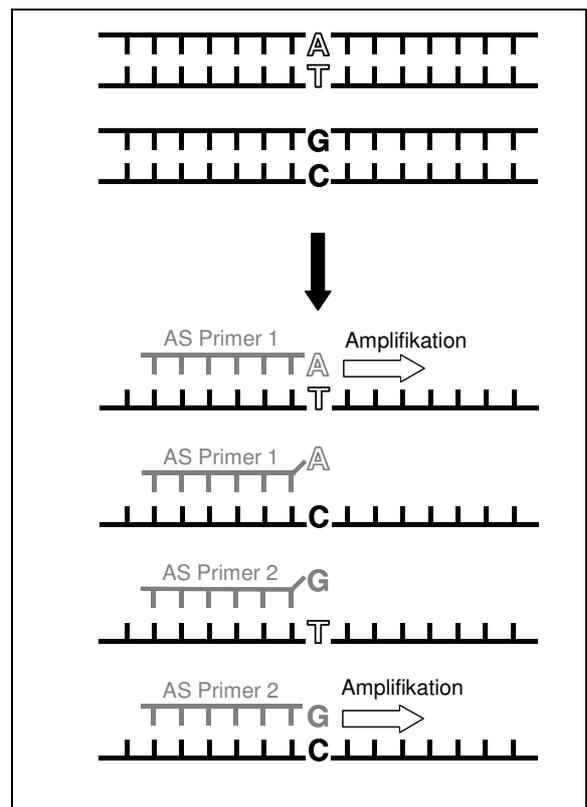


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips einer allel-spezifischen PCR

Die allel-spezifische PCR (AS-PCR) ist ebenfalls ein gelbasierender Markertyp zur SNP Genotypisierung. Bei dieser Technik wird einer der beiden Primer so konstruiert, dass sein 3'-Terminus genau am SNP Nukleotid endet. Dieser allel-spezifische Primer geht nur mit einem der beiden SNP Allele eine vollständige komplementäre Basenpaarung ein, wohingegen am anderen Allel eine Basenfehlpaarung am 3'-Terminus zustande kommt (Amplification Refractory Mutation System, ARMS, NEWTON et al. 1989). Durch diesen Mechanismus findet unter optimierten Reaktionsbedingungen eine allel-spezifische Amplifikation statt (UGOZZOLI & WALLACE 1991; **Abbildung 5**). Da die einzelne Basenfehlpaarung häufig für eine zuverlässige Allediskriminierung nicht ausreicht, wird die allel-spezifische Amplifikation oft in einer modifizierten Form angewandt. Durch einen zweiten PCR Primer, der strangaufwärts

vom allel-spezifischen Primer hybridisiert, wird eine konkurrierende Situation der beiden Oligonukleotide im Reaktionsansatz geschaffen. Dadurch kann die Sensitivität der allelischen Diskriminierung stark erhöht werden (MOHLER & JAHOOOR 1996). Ein ähnlicher positiver Effekt wird erzielt, wenn der allel-spezifische Primer eine künstliche Basenfehlpaarung an einer der 3'-subterminalen Basen für beide Allele aufweist. Bei diesem Mismatch Amplification Mutation Assay (MAMA, CHA et al. 1992) wird das Primer/Template Gefüge beim falschen Allel so stark destabilisiert, dass eine Amplifikation zuverlässig unterdrückt und die Sensitivität der allelischen Diskriminierung wesentlich erhöht werden kann.

Die Detektion von Mutationen mit der Single Nucleotide Primer Extension Technik (SnuPE) gehört zu den Minisequencing Verfahren. Es wird zunächst ein Oligonukleotid unmittelbar strangaufwärts vor der SNP Position an ein PCR Produkt hybridisiert. Dieses Oligonukleotid wird dann in einer cyclischen Sequenzier-Reaktion um ein Dideoxynukleotid (ddNTP) verlängert (SOKOLOV 1990, KUPPUSWAMY et al. 1991). Die Zuverlässigkeit einer thermostabilen Proof-Reading DNA Polymerase garantiert, dass wirklich nur ein komplementäres Nukleotid angehängt wird (**Abbildung 6**). Es sind mehrere Detektionsverfahren für Primer Extension Produkte bekannt. Sehr verbreitet ist der Einsatz von Dideoxynukleotid Terminatoren, die eine Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff besitzen. Die mit unterschiedlichen Farbstoffen markierten Primer Extension Produkte können dann auf einem mit einer CCD Kamera bestückten DNA Sequenziersystem detektiert werden. Daneben existiert das Arrayed Primer Extension (APEX) Verfahren, bei dem für jedes SNP Allel ein Detektionsoligonukleotid kovalent an einen Glasträger gebunden ist. Vor der Hybridisierung werden einzelsträngige PCR Produkte gebildet, indem einer der DNA Stränge mit einem Exonuklease Enzym abgebaut wird (SHUMAKER et al. 1996). Der Glasträger mit dem Hybrid von PCR Produkt und fluoreszenzmarkiertem verlängertem Oligonukleotid wird abschließend mit einem Fluoreszenzscanner erfasst.

Die Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight (MALDI-TOF) Massenspektrometrie ist eine Technik, bei der kleine DNA Moleküle anhand differierender Massen unterschieden werden können. Aufgrund der ungleichen molekularen Massen einzelner Nukleotide werden die unterschiedlichen Primer Extension Produkte mit dieser Technik massenspektrometrisch ohne eine Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen detektiert. Mit der MALDI-TOF Technologie ist eine SNP Detektion von

Primer Extension Produkten im Hochdurchsatzverfahren gut möglich (Ross et al. 1998; PARIS et al. 2002).

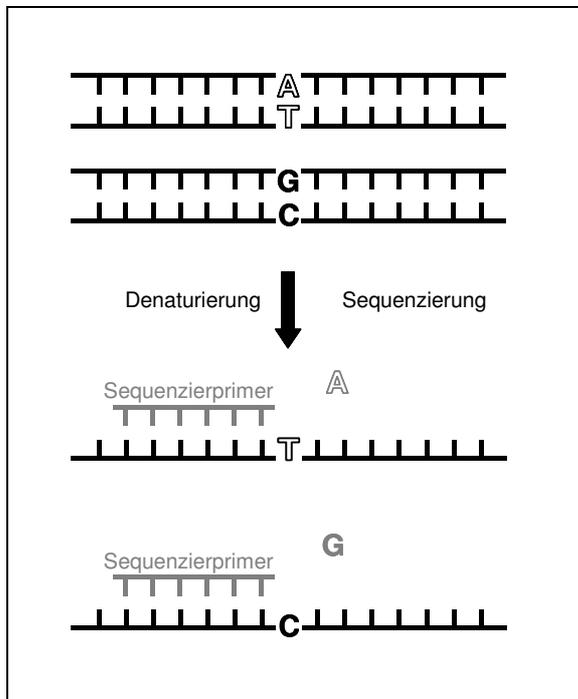


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips einer Primer Extension

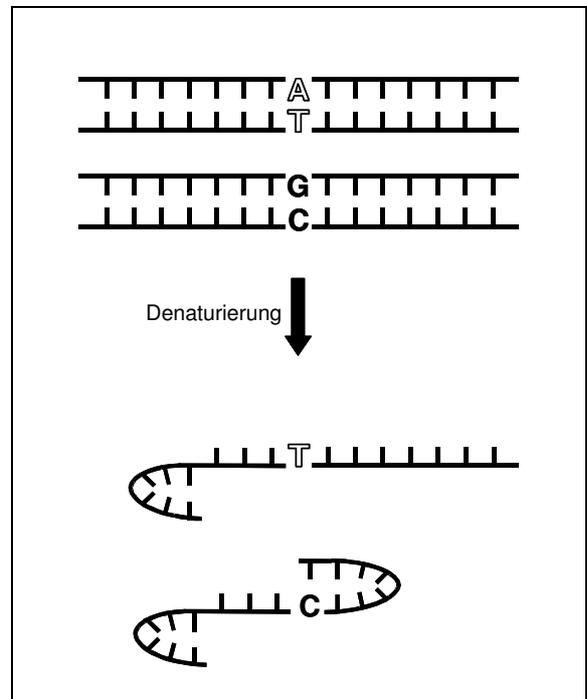


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips eines SSCP Markers

Die Pyrosequencing™ Technologie wird ebenfalls zu den Minisequencing Verfahren gezählt und verfolgt die Primer Extension Reaktion in Echtzeit. Bei dieser Technik wird das beim Einbau von Desoxynukleotridtriphosphaten freigesetzte anorganische Pyrophosphat bioluminometrisch detektiert (AHMADIAN et al. 2000). Die Genotypisierung erfolgt durch die aufeinanderfolgende Addition der Desoxynukleotridtriphosphate in der Primer Extension Reaktion. Da das bioluminometrisch erzeugte Licht zur Menge eingebauter Nukleotide proportional ist, kann die Pyrosequencing™ Technologie auch für eine Quantifizierung der SNP Allelfrequenzen in DNA Mischproben bis zu einem relativen Anteil von 10% angewandt werden. Durch die starke Automatisierung aller Analysenschritte bei der Pyrosequencing™ Technologie ist dieses Verfahren insbesondere für Hochdurchsatz Genotypisierungsprojekte sehr gut geeignet.

Die 'Single-Stranded Conformation Polymorphism Analysis' Technik (SSCP; ORITA et al. 1989) ist ein gelbasierendes Markersystem zur Detektion von SNP und InDel Mutationen. Die Alleldiskriminierung erfolgt anhand von Unterschieden in der Sekundärstruktur von einzelsträngigen PCR Fragmenten, die sich in einer oder mehreren

Nukleotiden unterscheiden (**Abbildung 7**). PCR Produkte mit der SNP Region werden denaturiert und anschließend auf hochauflösenden Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt. Unterschiede in der elektrophoretischen Mobilität von Amplikons aus Wildtyp- und mutanten Allelen lassen auf die An- oder Abwesenheit von SNPs schließen. Die SSCP Analyse ist ein sehr einfaches und kostengünstiges Analysensystem. Dieser Markertyp wird jedoch kaum noch verwendet, weil dabei die SNP Allele oft nicht zuverlässig zugeordnet werden können. Ein hoher Probendurchsatz wird mit dieser Technik schon aufgrund der aufwendig herzustellenden Polyacrylamid Gele nicht erreicht.

Die Heteroduplexanalyse basiert auf der unterschiedlichen elektrophoretischen oder chromatographischen Mobilität von Homoduplex und Heteroduplex DNA Molekülen. Das bedeutendste Verfahren dabei ist die Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC). Vor der DHPLC Analyse werden PCR Produkte von Wildtyp und anonymen Genotypen gemischt, denaturiert und anschließend wieder rehybridisiert. Die entstehenden Homo- und Heteroduplexe können mit einer Ion-Pair Reversed-Phase Chromatographie Säule und einer adäquaten mobilen Phase aufgetrennt werden (**Abbildung 8**). Bei einer Temperatur der mobilen Phase von annähernd denaturierenden Bedingungen und einem linearen Gradienten eines polaren Lösungsmittels werden Heteroduplexmoleküle früher als Homoduplexmoleküle von der Chromatographiesäule eluiert und dadurch eine Genotypisierung ermöglicht (OEFNER & UNDERHILL 1995, 1998). Mit diesem Prinzip kann die Anwesenheit verschiedener potentieller SNPs innerhalb eines untersuchten PCR Amplikons mit einer einzigen DHPLC Injektion detektiert werden. Darüber hinaus ist mit dieser Markertechnik eine Detektion unbekannter SNPs in einem bis zu 700 bp großen PCR Fragment möglich (OEFNER & UNDERHILL 1998). Aufgrund dieser Eigenschaft wird die DHPLC Analyse oft als Markersystem zur Vorselektion polymorpher DNA Sequenzen benutzt, um anschließend gezielt nur Fragmente mit Polymorphismen einer aufwendigen Sequenzanalyse unterziehen zu können (CHO et al. 1999).

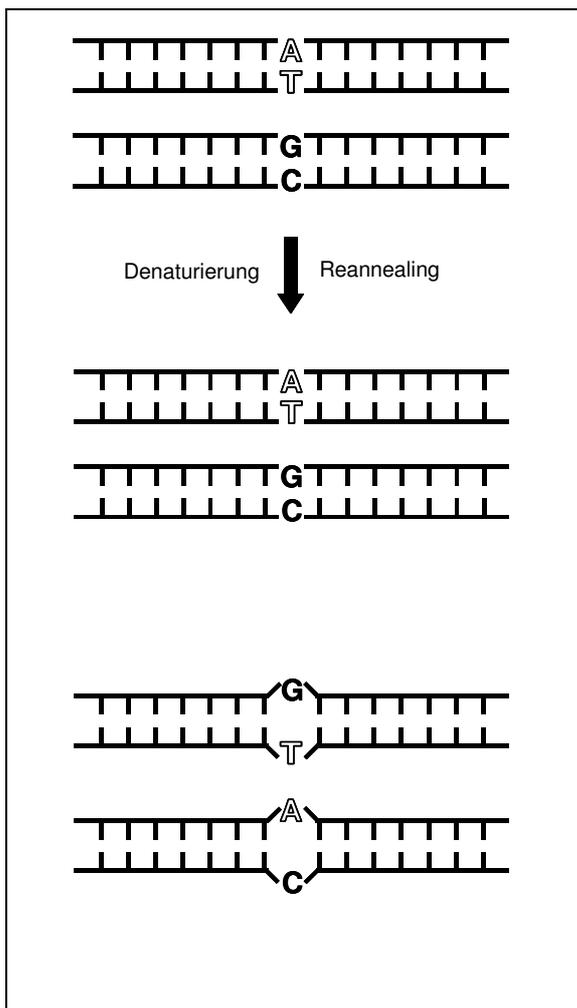


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips einer DHPLC Analyse

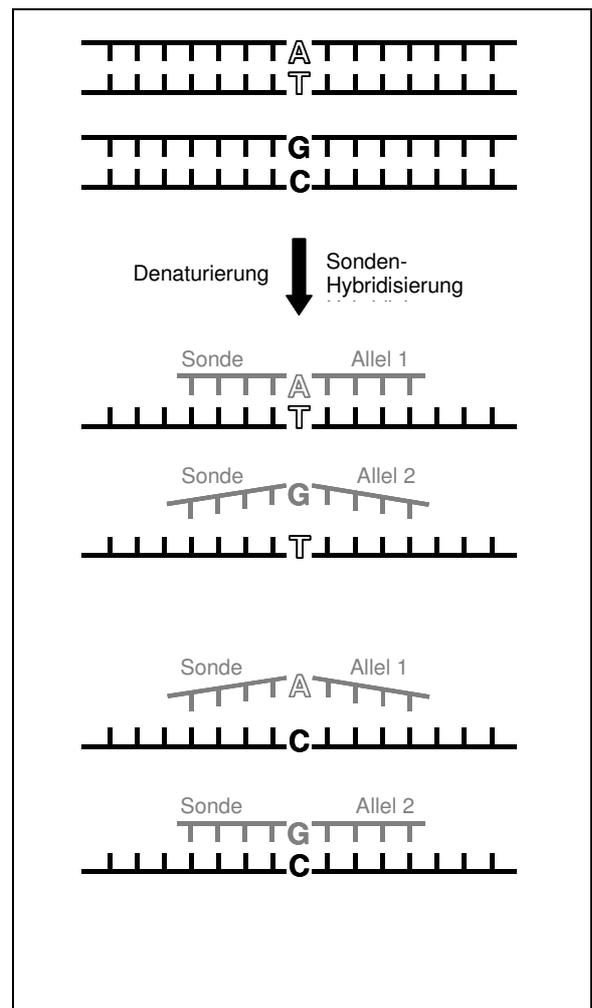


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips einer allel-spezifischen Hybridisierung

Die ausgesprochen hohe Sensitivität der DHPLC Technik bei der SNP Detektion wurde bei einer Studie an *Arabidopsis thaliana* demonstriert. Dabei wurden zwischen zwei Ökotypen mehr als 99% aller SNP und Indel Mutationen zuverlässig identifiziert (SPIEGELMAN et al. 2000). Ebenso wie bei der Pyrosequencing™ Technologie ist auch mit der DHPLC Technik eine weitgehende Automatisierung aller Analysenschritte möglich. Dadurch eignet sich dieses Markersystem auch besonders zur Realisierung von Genotypisierungsprojekten mit sehr großem Probenumfang.

Allel-spezifische Hybridisierungssonden sind ein sehr weit verbreitetes Werkzeug zur SNP Genotypisierung. Bei allen Varianten dieser Technologie werden Oligonukleotide benutzt, die im Bereich der Punktmutation hybridisieren. Durch den Unterschied in der Schmelztemperatur unterschiedlicher Sonden-Template Hybridklassen wird schließlich eine Diskriminierung der SNP Allele ermöglicht (**Abbildung 9**). In der Re-

gel werden die Oligonukleotid DNA Sonden möglichst kurz konstruiert, um eine reproduzierbare Differenzierung der SNP Allele zu ermöglichen. Die Detektion der unterschiedlichen Sonden/Template Komplexe kann über verschiedene Mechanismen erfolgen. Ursprünglich wurde das Allel-spezifische Hybridisierungsverfahren im Dot Blot Format eingesetzt. Unter entsprechend stringenten Bedingungen hybridisieren dabei nur vollständig komplementäre Sonden an membrangebundener DNA oder an PCR Fragmenten. Mittlerweile kann durch das weiterentwickelte PCR basierende Dynamische allel-spezifische Hybridisierungsverfahren (DASH) eine entsprechende Sonden/Template Bindung im Mikrotiterformat durchgeführt werden (HOWELL et al. 1999). Bei dieser Methode werden PCR Primer mit Biotin Markierung verwendet. Das Amplikon mit der SNP Region bindet folglich an einer Streptavidin beschichteten Oberfläche und wird anschließend unter alkalischen Bedingungen denaturiert. Zu dem einzelsträngigen DNA Molekül werden Oligonukleotid Sonden gegeben, die nur zu einem der beiden SNP Allele vollständige Komplementarität besitzen. Schließlich werden die Unterschiede in den Schmelzkurven aller möglicher Sonden-Template Hybridtypen ermittelt, indem man die Höhe der Fluoreszenzemission eines interkalierenden Doppelstrang-spezifischen Farbstoffes während einer Temperaturerhöhung misst. Eine Genotypisierung von vielen SNP Loci im Hochdurchsatzverfahren ist mit diesem Prinzip besonders gut möglich, wenn die Oligonukleotidsonden an einen DNA Chip in hoher Dichte gebunden werden (WANG et al. 1998).

Unter Verwendung von allel-spezifischen Hybridisierungs sonden ist auch eine SNP Genotypisierung in real time PCR Experimenten möglich. Bei dieser Technologie werden die amplifizierte DNA Fragmente während der laufenden PCR mit Hilfe des fluorogenen Farbstoffes SYBR Green (SCHNEEBERGER et al. 1995) detektiert, der ausschließlich in doppelsträngiger DNA interkaliert. Daneben sind allel-spezifische Oligonukleotide wie Taqman™ und Molecular Beacon™ DNA Sonden bekannt, die eine Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen besitzen. Bei beiden Systemen können zur Detektion der jeweiligen SNP Allele unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden. Am 5' Enden einer Taqman™ Sonde befindet sich ein fluorogener Reporterfarbstoff, während sich am 3' Ende ein Quencher molekül befindet. In einer intakten Taqman™ Sonde wird die Fluoreszenz des Reporters durch den in räumlicher Nähe platzierten Quencher nach dem Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Prinzip unterdrückt. Nach der Hybridisierung an die Zielsequenz wird die

Sonde in der folgenden PCR Extensionsphase durch die 5'→3' Exonuklease Aktivität der fortschreitenden *Taq* DNA Polymerase hydrolysiert. Die räumliche Trennung des Reporter- und des Quencher-moleküls bewirkt einen Anstieg des Fluoreszenzsignals, dessen Höhe der Menge an gebildetem PCR Produkt proportional ist.

Im Gegensatz zur linearen Taqman™ Sonde formen die Molecular Beacons™ durch Komplementarität der 5' und 3' terminalen Sequenz eine Haarnadelstruktur, wodurch der Reporter und der Quencher in unmittelbare Nähe gebracht werden. Bei einer korrekten Basenpaarung des Molecular Beacon™ an die SNP Region klappt die Haarnadelstruktur der Sonde auseinander. Dadurch wird eine Emission des Fluoreszenzsignals während des PCR Annealing Schrittes ermöglicht und dieses kann dann in Echtzeit detektiert werden. Die Detektion der Template-Sonden Hybride mit der Fluoreszenzfarbstoffmarkierung geschieht bei den Molecular Beacons™. während der PCR Annealingphase

Daneben existieren noch weitere allel-spezifische Hybridisierungsverfahren zur SNP Genotypisierung in real time PCR Experimenten. Das Scorpion™ Markersystem kombiniert Primer und Hybridisierungssonde in einem DNA Oligonukleotid (THELWELL et al. 2000). Beim Padlock™ System werden Oligonukleotid Sonden benutzt, die bei einer Erkennung der Zielsequenz innerhalb einer isothermischen Rolling Circle Amplifikation in Ringe ligiert werden (NILSSON et al. 1997). Das Invader™ System beinhaltet eine FLAP 5'-Endonuklease. Dieses Enzym hydrolysiert spezifisch die dreidimensionale Struktur, die durch eine Überlappung der Invader™ und der allelspezifischen Sonde eingenommen wird (LYAMICHEV et al. 1999).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterial und Chemikalien

Eine Beschreibung der verwendeten Puffer und Lösungen erfolgt unter den entsprechenden methodischen Absätzen. Hersteller und Spezifikationen der benutzten Chemikalien bzw. Agenzien sind folgender Auflistung zu entnehmen:

Tabelle 3: Chemikalien und Agenzien

Chemikalie/Agens	Spezifikation	Hersteller
β-Mercaptoethanol	14,3 M	Roth, Karlsruhe
Acetonitril	reinst	J.T. Baker, Phillipsburg, USA
Agarose		Roth, Karlsruhe
Agarose MetaPhor	high resolution agarose	FMC, Rockland, USA
Ampicilin	reinst	Roche Diagnostics, Mannheim
APS	rein	Amresco, Ohio, USA
ATP		Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Bacto-Agar		Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton		Difco, Detroit, USA
Benzimidazol		VWR International, Darmstadt
Borsäure	p.a.	Amresco, Ohio, USA
Bromphenolblau		Sigma-Aldrich, Seelze
Chloroform	p.a.	J.T. Baker, Phillipsburg, USA
CTAB	p.a.	Sigma-Aldrich, Seelze
dATP		PeqLab, Erlagen
dCTP		PeqLab, Erlagen
dGTP		PeqLab, Erlagen
dTTP		PeqLab, Erlagen
Dextran Blau		Fluka, Neu-Ulm
EDTA	p.a.	Sigma-Aldrich, Seelze
Eisessig	p.a.	VWR International, Darmstadt
Ethidiumbromid	reinst	Roth, Karlsruhe
Ethanol	p.a.	Sigma-Aldrich, Seelze
Formamid	p.a.	Amresco, Ohio, USA
Glucose	p.a.	VWR International, Darmstadt
Glycerin	99,5%	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	reinst	Amresco, Ohio, USA

Chemikalie/Agens	Spezifikation	Hersteller
HCl	p.a.	J.T. Baker, Phillipsburg, USA
Hefe-Extrakt		Difco, Detroit, USA
IPTG	p.a.	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol	p.a.	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	p.a.	Roth, Karlsruhe
KCl	p.a.	Roth, Karlsruhe
Long Ranger Gellösung	50% Acrylamidlösung	FMC, Rockland, USA
NaAc	p.a., krist.	VWR International, Darmstadt
NaCl	p.a.	VWR International, Darmstadt
NaOH	p.a.	VWR International, Darmstadt
SDS	krist.	Serva, Heidelberg
SDS	2x krist.	Serva, Heidelberg
TEMED	p.a.	Amresco, Ohio, USA
Tetracyclin	p.a.	USB, Cleveland, USA
TEAA	p.a.	Roth, Karlsruhe
Tris	krist.	Sigma-Aldrich, Seelze Amresco, Ohio, USA
X-Gal	p.a.	Roth, Karlsruhe
Xylen-Cyanol		Fluka, Neu-Ulm

2.1.2 Enzyme und Kits

Tabelle 4: Enzyme

Enzym	Hersteller
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden
Ampli <i>Taq</i> Gold Hot Start DNA-Polymerase	PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
<i>Taq</i> DNA-Polymerase - <i>Pwo</i> DNA-Polymerase Enzym Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Stratagene, La Jolla, CA, USA
RNAse A	Qiagen, Hilden
<i>Pst</i> I	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
<i>Ita</i> I	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Scal</i> I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Tabelle 5: Kits

Kit	Hersteller
Nucleo Spin Plant DNA Isolation Kit	Macherey Nagel, Düren
DNeasy Plant DNA Isolation Kit	Qiagen, Hilden
E.Z.N.A. Plant DNA Mini Kit	PeqLab, Erlagen
High Pure Plasmid Purification Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
2x TaqMan Mastermix [®]	PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England
TOPO TA Cloning [®] Kit for Sequencing	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
PicoGreen [®] dsDNA Quantitation Reagent	Molecular Probes, Leiden, Niederlande

2.1.3 PCR Oligonukleotide

Die Auftragssynthese für die PCR Oligonukleotide erfolgte durch Applied Biosystems. **Tabelle 6** beschreibt die Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer und Sonden, die PCR Annealingtemperaturen und die jeweiligen Einsatzgebiete.

Tabelle 6: Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	TM (°C)	Einsatzgebiet	Ziel
14f 3r	GCGGGATGTTAATAACGGATGAT GGAGCCATAGGTAATCTATCG	60	CAPS, AS PCR, DHPLC	<i>B. graminis</i>
BG-Cytb-f BG-Cytb-r	TCGTGAAGTGCTATTAAGTGCAT CACAGCTTCAGCTTTCTTTTCT	56	DHPLC	<i>B. graminis</i>
M13 (-20)-f M13-r	GTAAAACGACGGCCAGT GGAAACAGCTATGACCATG	56	Sequenz Analyse	Plasmide
PI-Cytb-f PI-Cytb-r	TCGTTAGCCGGTATTATGTTAGTA TGGATTATTAGAACCAACTTCATG	56	Sequenz Analyse	<i>P. infestans</i> <i>P. viticola</i>
PV-D2-f PV-D2-r	ATTATCAACGGCGAATCCACCC ACACCCCGCATATTGATTTAGCAT	63	qPCR Standard	<i>P. viticola</i>
PV-N-f PV-N-r	AATCCACCCATAACCAGTCAAC ACATGCGAATGGTGCATCTTTT	52	DHPLC	<i>P. viticola</i>

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	TM (°C)	Einsatzgebiet	Ziel
¹ PV-R-MGB-F ³	CGAGAATAAATTTGTAATAACTGTTGCT <u>G</u>	61	qPCR ARMS	<i>P. viticola</i>
¹ PV-R-MGB-P ^{4,6}	ATTTGTCCCCAAGGCA			
¹ PV-R-MGB-R	AGAGAAGCTTTATGGTGTTCAGGG			
² PV-C-MGB-F	ATCGAATTAACCAACCGTTATTTACATC	61	qPCR Referenz	<i>P. viticola</i>
² PV-C-MGB-P ^{5,6}	CGCATAATATGTTCAACACT			
² PV-C-MGB-R	CCCCGCATATTGATTTAGCATTTA			
Rf	GCAGATGAGCCACTGGGC	60	AS PCR	<i>B. graminis</i>
Sf	GCAGATGAGCCACTGGGG			
ST-511-r	TTAGGACGAATTACGACCTTG	49	Sequenz Analyse	<i>S. tritici</i>
ST-91-f	GGTGTACTTTAGCCATGCACTA			
ST-mut-bf	TATAACTGTTGCTGCTCATAAAGACATTTGAC	50	DHPLC, Mutagenese	<i>S. tritici</i>
ST-mut-br	TTAACTCAGTTGAACACATAATGAGAG			
ST-mut-sf	ACTATGTCTTGTCCTCAACTCAAGGTATTG			
ST-mut-sr	GTCAAATGTCTTTATGAGCAGCAACAGTTATA			
VI-het-f	TTACAGCCTTCCTGGGTTATGT	50	CAPS, DHPLC	<i>V. inaequalis</i>
VI-het-r	GAGTGCTATACCGTGAATAGGACA			

¹qPCR Oligonukleotide für den ARMS Assay; ²qPCR Oligonukleotide für den Referenz Assay; ³Allelspezifischer qPCR ARMS Primer mit einem künstlich eingeführten Mismatch an der (3'-1)-terminalen Base (unterstrichen); ⁴MGB-Sonde für den ARMS Assay mit dem Reporterfarbstoff FAM am 5'-terminalen Ende; ⁵MGB-Sonde für den Referenz Assay mit dem Reporterfarbstoff VIC am 5'-terminalen Ende; ⁶Beide Sonden besitzen einen nicht-fluoreszenten Quencher am 3'-Terminus

2.1.4 Pilzmaterial

Die in dieser Arbeit untersuchten *B. graminis* f.sp. *tritici* und *B. graminis* f.sp. *hordei*, *Septoria tritici*, *Venturia inaequalis* und *Plasmopara viticola* Isolate entstammten der Pathogenkollektion der EpiLogic GmbH (Freising, Weihenstephan) aus den Jahren 2000-2002.

2.2 Methoden

2.2.1 Sammlung, Erhaltung und 'In-vivo' Klassifizierung der Pathogenisolate

Isolate von *B. graminis* f.sp. *tritici*, *B. graminis* f.sp. *hordei*, *Venturia inaequalis* und *Plasmopara viticola* wurden mit einer auf einem PKW montierten Düsen-sporen-falle gesammelt (SCHWARZBACH 1979; FELSENSTEIN 1994). *Septoria tritici* Isolate wurden in Form von infizierten Weizenblättern aus Feldbeständen gewonnen. Eine beprobte Region in Europa umfasste ca. 100 km Fahrstrecke. Sensitive Standardisolate aller hier beschriebenen Pathogene wurden bereits vor der Markteinführung der QoI Fungizide eingesammelt. *B. graminis* f.sp. *tritici* und *B. graminis* f.sp. *hordei* Isolate wurden nach FELSENSTEIN (1994) mit dem Blattsegment Test auf phänotypische Reaktion gegenüber QoI Fungizide charakterisiert. Als Wirtsgewebe dienten Blattsegmente der Weizensorte 'KANZLER' (*B. graminis* f.sp. *tritici*) und der Gerstensorte 'VENUS' (*B. graminis* f.sp. *hordei*). Die Isolate wurden auf unbehandelten Pflanzen erhalten und regelmäßig auf frisches Blattmaterial übertragen. *Venturia inaequalis* und *Plasmopara viticola* Isolate wurden nach HEANY & LORENZ 1997; OLAYA & KÖLLER 1999; HEANY et al. 1997; KÜNG FÄRBER et al. 2002 mit Blattscheiben-Tests auf ihre Sensitivität gegenüber QoI Fungizide klassifiziert. Bei diesen Tests dienten Apfelblätter der Sorte 'GOLDEN DELICIOUS' (*V. inaequalis*) und Weinblätter der Sorte 'TROLLINGER' (*P. viticola*) als Wirtsgewebe. Die *Venturia inaequalis* Isolate wurden auf unbehandelten Pflanzen erhalten und regelmäßig auf frisches Gewebe übertragen. *Plasmopara viticola* Isolate wurden zur Archivierung auf infiziertem Blattmaterial bei -20 °C eingefroren und bei Bedarf auf frisches Blattmaterial inokuliert. *Septoria tritici* Isolate wurden nach CHIN et al. 2000 auf Malz-Hefeextrakt-Agar vermehrt und auf Sensitivität gegenüber QoI Fungizide getestet. Die Archivierung der Isolate erfolgte entweder als infiziertes Blattmaterial bei 4 °C oder auf dem Malz-Hefeextrakt-Agar bei -20 °C.

2.2.2 DNA Isolation

Für die molekularen Tests wurde Gesamt DNA aus infiziertem Wirtsgewebe isoliert. Bei diesem Verfahren konnten neben genomischer DNA aus der Pflanze und dem Pathogen auch ausreichende Mengen pilzlicher mitochondrialer DNA gewonnen werden. Um eine hohe Ausbeute an mitochondrialen Cytochrom *b* Kopien in der DNA Lösung zu gewährleisten, wurde stets darauf geachtet, möglichst stark befallene

3x SDS-Puffer

3,0% (w/v)	SDS
700 mM	NaAc, pH 5,2
10 mM	EDTA, pH 8,0
1,0% (w/v)	β-Mercaptoethanol

ne Wirtsblätter bei der DNA Isolation zu verwenden. Bei allen Untersuchungen an *B. graminis* f.sp. *tritici* und *B. graminis* f.sp. *hordei* wurde zur DNA Isolation eine abgewandelte CTAB-Methode (SAGHAI-MAROOF et al. 1984) mit 3%igem SDS Isolationspuffer angewandt. Ein infiziertes Blattsegment

wurde bei 60 °C mit 1 ml Extraktionspuffer für 60 min in einem 2 ml Reaktionsgefäß im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach zweifacher Chloroform Extraktion wurde die DNA mit 100% Isopropanol gefällt. Das DNA Pellet wurde mit 75% Ethanol gewaschen und anschließend mit 50 µl demineralisiertem Wasser rückgelöst.

Die DNA Isolation bei *Septoria tritici*, *Venturia inaequalis* und *Plasmopara viticola* geschah mit dem NucleoSpin Plant Kit (Macherey Nagel). Luftgetrocknete infizierte Blätter wurden zusammen mit ca. 30-40 Glasperlen (3 mm) in 50 ml Schraubdeckeldosen gefüllt und anschließend für 3 min bei 10.000 Hz in einer Retsch Schwingmühle MM301 zerkleinert. Von dem pulverisierten Probenmaterial wurden 15-20 mg mit C1 Lysepuffer aus dem Kit versetzt und übernacht bei Raumtemperatur inkubiert. Um PCR Inhibitoren zuverlässig zu entfernen, wurde der Waschschrift mit dem Puffer CW dreimal wiederholt. Der weitere Ablauf der DNA Isolation geschah nach Herstellerprotokoll. Eine Konzentrationsbestimmung der DNA von Feldisolaten wurde nicht durchgeführt, weil durch den genomischen Hintergrund in der Gesamt DNA von Wirt und Pathogen nicht auf die Anzahl pilzlicher Cytochrom *b* Kopien geschlossen werden kann.

2.2.3 Herkunft der mitochondrialen Cytochrom *b* Nukleotidsequenzen

In der EMBL-Gendatenbank (www2.ebi.ac.uk) sind einige Cytochrom *b* Nukleotidsequenzen von pilzlichen Organismen publiziert. Die in **Tabelle 7** aufgelisteten Sequenzinformationen wurden im Rahmen dieser Arbeit zur Entwicklung von molekularen Markersystemen verwendet.

Tabelle 7: Pilzliche Cytochrom *b* Nukleotidsequenzen der EMBL-Gendatenbank

Pathogen	Akzessionsnummer
<i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>tritici</i>	EMBL: AF343441
<i>Venturia inaequalis</i>	EMBL: AF004559
<i>Septoria fijiensis</i>	EMBL: AY247413
<i>Phytophthora infestans</i>	EMBL: MIP11U170

Mit Hilfe der Cytochrom *b* Nukleotidsequenz von *B. graminis* f.sp. *tritici* wurden die PCR Primer 14f und 3r konstruiert, mit denen auch bei *B. graminis* f.sp. *hordei* ein PCR Fragment aus dem entsprechenden Gen amplifiziert werden konnte. Die veröffentlichte Cytochrom *b* Nukleotidsequenz von *Venturia inaequalis* wurde für die Entwicklung der Primer VI-het-f und VI-het-r genutzt. Von der publizierten Cytochrom *b* Nukleotidsequenz von *Septoria fijiensis* wurden diverse PCR Primer abgeleitet, mit denen unter unspezifischen PCR Bedingungen (PCR Annealingtemperatur: 49°C, MgCl₂ Konzentration: 3,5 mM), ein Fragment aus dem Cytochrom *b* Gen von *Septoria tritici* amplifiziert werden konnte. Die PCR Primer PI-Cytb-f und PI-Cytb-r wurden von der Nukleotidsequenz des Cytochrom *b* Gens von *Phytophthora infestans* abgeleitet. Mit diesen PCR Primern konnte auch bei *Plasmopara viticola* ein Fragment des Cytochrom *b* Gens amplifiziert werden.

2.2.4 Rekombinante DNA Techniken

Die Klonierung von PCR Produkten wurde mit dem TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequenzierung nach Herstellerangaben (Invitrogen) durchgeführt. PCR Produkte, die von *Taq* DNA Polymerasen synthetisiert werden, weisen ein einzelnes 3'-überhängendes Adenosin Nukleotid auf. Deshalb können diese Amplikons in den Plasmidvektor pCR[®] 4-TOPO (Invitrogen) ligiert werden. Die Ligation erfolgte mit Hilfe der am Plasmidvektor gebundenen Topoisomerase I durch Inkubation bei RT für 5 min. An-

schließlich wurden die Plasmide in One Shot[®] TOP10 chemisch kompetente *E. coli* (Invitrogen) transformiert.

LB-Medium:

1,0% (w/v)	Trypton
0,5% (w/v)	Hefeextrakt
0,5% (w/v)	NaCl

Indikatorplatten:

LB-Medium	
1,5% (w/v)	Bacto-Agar
60 µg/ml	IPTG
60 µg/ml	X-Gal
100 µg/ml	Ampicillin
10 µg/ml	Tetracyclin

Dem Transformationsansatz wurde 250 µl SOC Medium (Invitrogen) zugegeben und anschließend für 1 h bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Von diesem Ansatz wurden 20 µl und 200 µl auf zwei Indikatorplatten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert. Nach einer Inkubation bei 37 °C übernacht konnten auf den Platten ausschließlich transformierte Klone gepickt werden, da nur bei einer erfolgreichen Transformation das Lethalgen *ccdB* auf dem Plasmidvektor inaktiviert wird. Gepickte Klone wurden in einen Standard PCR Mastermix mit den Plasmidprimern M13(-20) und M13 reverse getaucht und eine Kontroll PCR durchgeführt. Anschließend wurden die Klone mit 5 ml selektivem LB-Medium auf einem Taumelschüttler übernacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurden nach Erreichen einer OD_{600nm} von 0,5 aus 3ml Bakteriensuspension die Plasmide isoliert. Dies geschah mit dem High Pure Plasmid Purification[®] Kit (Roche Diagnostics) nach Aufschluss der Bakterienzellen mittels alkalischer Lyse (BIRNBOIM & DOLY 1979). Abschließend wurden 1 ml Stammkulturen von den Klonen mit einer Glycerinkonzentration von 50% angelegt und bei -80 °C eingelagert.

2.2.5 Sequenzanalyse

DNA Sequenzanalysen wurden unter Verwendung des DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kits (Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt. Dieser Kit funktioniert nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (SANGER et al. 1977). Die PCR Produkte wurden mit dem TA Cloning Kit (Invitrogen) in den Vektor pCR[®] 4-TOPO kloniert und anschließend jeweils fünf Klone von beiden Seiten mit den Primern M13 (-20) und M13 reverse sequenziert. Die Sequenzierreaktionen mit einer thermostabilen Polymerase und vier mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Terminatoren erfolgten in einem GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer) nach Protokollangaben des Herstellers. Die Sequenzierprodukte wurden mit einer Ethanol-fällung aufgereinigt und über eine vertikale Polyacrylamidgelelektrophorese auf einem ABI PISM[™] 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer) aufgetrennt. Die unterschiedlich

markierten DNA Fragmente wurden während der Elektrophorese online detektiert. Die Auswertung der DNA Sequenzen erfolgte mit der 'Sequence Navigator' Software, Version 1.0.1 (Perkin-Elmer), und dem Multiple Sequence Alignment Algorithmus 'Clustal W' auf www.ebi.ac.uk/clustalw (THOMPSON et al. 1994).

2.2.6 Einführung eines Nukleotidaustausches in ein PCR Amplikon

Die Herstellung künstlicher mutanter Allele von *Septoria tritici* erfolgte durch einen Nukleotidaustausch in einem PCR Amplikon (Site Directed Mutagenesis; FISHER & PEI 1997). Im ersten Schritt wurde jeweils ein Fragment rechts und links der SNP Region mit einer Proofreading Polymerase aus genomischer DNA amplifiziert. Bei beiden Fragmenten wurde die SNP Region jeweils von einem Mismatch Primer umspannt, wodurch die erwünschte Mutation eingeführt werden konnte. Diese beiden Fragmente wurden im nächsten Schritt gemischt. Eine Hybridisierung der jeweils überlappenden komplementären Enden wurde durch die Länge der beiden Mismatch Primer von 30 bp begünstigt. Im folgenden Schritt konnten beiden Stränge aufgefüllt werden, da jeder überhängende Strang für den jeweils anderen als Vorlage für die *Taq*-Polymerase dient. Schließlich wurde mit den beiden äußeren Primern das komplette PCR Produkt, inklusive der neu eingeführten Punktmutation, mit einer *Taq*-Polymerase amplifiziert und mit dem TA-Cloning Kit in den Vektor pCR[®] 4-TOPO kloniert. Diese Plasmide dienten bei den molekularen Analysen als mutanter Standard.

Tabelle 8: Parameter der Site Directed Mutagenesis (nach FISHER & PEI 1997)

Ansatz der Mutagenesis PCR		Amplifikation	
genomische DNA	1,0 µl		
Primer sf (bzw. bf)	0,2 µM	95°C	45 s
Primer sr (bzw. br)	0,2 µM	95°C	45 s
dNTPs	200 µM	60°C	45 s
<i>Pfu</i> Polymerase	1,0 U	72°C	1 min
PCR-Puffer	1x	72°C	10 min
ad	20 µl		

Ansatz der Auffüllreaktion		Inkubation	
Fragment 'sf+sr'	0,2 µM		
Fragment 'bf+br'	0,2 µM	95°C	1 min
dNTPs	200 µM	55°C	45 s
<i>Pfu</i> Polymerase	0,25 U	72°C	45 min
PCR-Puffer	1x		
ad	10 µl		

Amplifikation der künstlichen SNP Allele		Amplifikation	
DNA Fragmente	1,0 µl		
Primer sf (bzw. bf)	0,2 µM	94°C	2 min
Primer sr (bzw. br)	0,2 µM	94°C	1 min
dNTPs	200 µM	60°C	1 min
<i>Taq</i> Polymerase	1,0 U	72°C	1 min
PCR-Puffer	1x	72°C	10 min
ad	20 µl		

2.2.7 Allel-spezifische PCR

Bei der allel-spezifischen Amplifikation erfolgte die Diskriminierung der SNP Allele über einen PCR Primer (Amplification Refractory Mutation System, ARMS, NEWTON et al. 1989). Der allel-spezifische Forward Primer Sf, bzw. Rf reichte mit seiner 3'-terminalen Base in das SNP Nukleotid hinein. Strangaufwärts befand sich ein weiterer Forward Primer, der nicht an der SNP Detektion beteiligt war. Mit diesem 'Nested PCR System' wurde eine konkurrierende Situation der beiden Oligonukleotide um die Polymerase geschaffen. Dadurch sollte die Sensitivität und Stabilität der allel-spezifischen PCR Analyse erhöht werden. Die allel-spezifische Amplifikation mit den Primern 14f + 3r + Sf bzw. 14f + 3r + Rf wurde auf einem GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer) durchgeführt. Nach der Amplifikation wurden die PCR Produkte auf einem 2,0% Agarosegel mit 1xTAE aufgetrennt. Bei dieser allel-spezifischen PCR Analyse wird zusätzlich zum diagnostischen kürzeren Fragment bei allen Genotypen ein längeres Fragment amplifiziert, das aus den beiden flankierenden Primern

14f + 3r hervorgeht. Dieses unspezifisch amplifizierte Fragment konnte als PCR Positivkontrolle genutzt werden. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurde jedes Isolat in einem doppelten Ansatz, mit jeweils einem der beiden allel-spezifischen Primern (Sf bzw. Rf) getestet. Zur Auftrennung der PCR Produkte wurden diese doppelten Ansätze jeweils untereinander auf das Gel geladen. Daraus resultierende komplementäre Bandenmuster von resistenten und sensitiven Einzelsporenisolaten, erleichterten die visuelle Genotypisierung.

Tabelle 9: Parameter der allel-spezifischen PCR Analyse

PCR Ansatz		Amplifikation		
DNA	1,0 µl			
Primer 14f	0,2 µM	94 °C	2 min	
Primer 3r	0,2 µM	94 °C	1 min	} 34x
Primer Sf bzw. Rf	0,2 µM	60 °C	1 min	
dNTPs	200 µM	72 °C	1 min	
Taq Polymerase	0,5 U	72 °C	10 min	
PCR-Puffer	1x			
	ad 20 µl			

2.2.8 Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) Analyse

Die CAPS Analyse erfolgte nach der von SIEROTZKI et al. (2000a) beschriebenen Methode zur qualitativen Detektion der G143A Mutation bei *B. graminis* f.sp. *tritici*. Zunächst wurde auf einem GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer) mit den Primern 14f + 3r ein 465 bp großes Fragment aus dem Cytochrom *b* Gen amplifiziert. Eine erfolgreiche Amplifikation wurde auf einem 1,5% Agarosegel mit 1xTAE überprüft. Anschließend wurden die PCR Produkte mit 1/10 Volumen 3M NaAc (pH 5,2) und 100% Ethanol gefällt, mit 75% Ethanol gewaschen und in 10µl demineralisiertem Wasser rückgelöst. Von dem gereinigten PCR Produkt wurden 2 µl mit 1,0 Unit der Restriktionsendonuklease *ItaI* (5'-GC|NGC-3') gemäß Herstellerangaben (Roche Diagnostics) für 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die hydrolysierten PCR Fragmente wurden auf einem 2,0% Agarosegel mit 1xTAE aufgetrennt und visuell ausgewertet. Neben einer vorhandenen Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *ItaI* (5'-GC|NGC-3') in PCR Amplikons von *B. graminis* f.sp. *tritici* und *B. graminis* f.sp. *hordei* schafft die Punktmutation, die für den G143A Aminosäureaustausch verantwortlich ist, eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle. Infolgedessen werden PCR Produkte von sensitiven Isolaten in zwei, PCR Produkte von resistenten Isolaten in drei Restriktionsfragmente hydrolysiert.

Tabelle 10: Parameter der CAPS Analyse

PCR Ansatz		Amplifikation	
DNA	1,0 µl		
Primer 14f	0,2 µM	94°C	2 min
Primer 3r	0,2 µM	94°C	1 min
DNTPs	200 µM	60°C	1 min
Taq Polymerase	0,5 U	72°C	1 min
PCR-Puffer	1x	72°C	10 min
	ad 20 µl		

Restriktions-Ansatz		Inkubation	
Gefälltes PCR Prod.	2,0 µl		
<i>Ital</i>	1,0 U	37°C	16 h
Puffer H	1x		
	ad 20 µl		

Bei PCR Amplikons aus dem Cytochrom *b* Gen von *Venturia inaequalis* existierte neben der allel-spezifischen Restriktionsschnittstelle keine weitere Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Ital*. Dementsprechend konnte bei resistenten Isolaten von *Venturia inaequalis* zwei Fragmente detektiert werden, während das Amplikon von sensitiven Isolaten nicht hydrolysiert wurde.

2.2.9 DHPLC Analyse

Die 'Denaturing High Performance Liquid Chromatography' (DHPLC) Analyse wurde zur Detektion der G143A Mutation bei den Pathogenen *B. graminis* f.sp. *tritici*, *B. graminis* f.sp. *hordei*, *Septoria tritici*, *Venturia inaequalis* und *Plasmopara viticola* eingerichtet. Bei jedem Pathogen wurde zunächst mit den pathogenspezifischen PCR Primern (**Tabelle 6:** Oligonukleotide) ein Fragment amplifiziert, das die SNP Region umspannt. Zusätzlich dazu wurde für jedes anonyme Isolat ein separater PCR Ansatz mit einem sensitiven Standardisolat mitgeführt.

Tabelle 11: Parameter der DHPLC PCR (nach OEFNER & UNDERHILL 1995)

PCR Ansatz		Amplifikation		
DNA	1,0 µl			
Primer Forward	0,2 µM	94°C	10 min	
Primer Reverse	0,2 µM	94°C	1 min	} 34x
dNTPs	200 µM	50-60°C	1 min	
Hot Start <i>Taq</i>		72°C	1 min	
DNA Polymerase	1,0 U	72°C	10 min	
PCR-Puffer	1x			
	ad 20 µl			

Aliquote aller PCR Produkte wurden auf einem 1,5% Agarosegel mit 1xTAE aufgetrennt um die Qualität der Amplifikation visuell beurteilen zu können. Die PCR Fragmente der anonymen und der Wildtyp Isolate müssen bei diesem Analysensystem identische Konzentrationen aufweisen. Schließlich wurde der PCR Ansatz des anonymen und des Wildtyp Isolates in äquimolaren Verhältnissen gemischt. Dieses Gemisch wurde für 3 min bei 95°C denaturiert und danach innerhalb von 30 min auf 60°C abgekühlt. Durch dieses Reannealing wurde die Bildung der Heteroduplexe ermöglicht.

DHPLC Puffer A	
0,1 M	TEAA
0,1 mM	EDTA (pH 8,0)
DHPLC Puffer B	
0,1 M	TEAA
0,1 mM	EDTA (pH 8,0)
25 % (v/v)	Acetonitril

Die Heteroduplexanalyse erfolgte auf einem Varian DHPLC System (Varian Inc.) mit einer Varian Helix™ Chromatographie Säule (3 Mikron x 75 mm). Die Berechnung der kritischen Ofentemperatur zur optimalen Differenzierung der Homo- und Heteroduplexpeaks geschah mit einem Schmelzpunkt-Algorithmus, der online verfügbar ist. Berechnungsgrundlage für die kritische Analysentemperatur ist die Sequenzinformation der PCR Amplikons (www.insertion.stanford.edu/melt.html). Die Analysenparameter wurden zur Optimierung des Verfahrens gegebenenfalls manuell korrigiert. Sämtliche Analysen erfolgten bei einem linearen Universal Gradienten (**Tabelle 12**) und einer Flussrate von 0,45 ml/min. Die Probenzuführung erfolgte mit einem Autosampler und die Elutionsprofile wurden visuell ausgewertet.

Tabelle 12: Universal Gradient zur Heteroduplexanalyse mit der Varian Helix™ Chromatographie Säule

Zeit (min)	Fluss (ml/min)	Puffer A (%)	Puffer B (%)
0,0	0,45	65	35
1,0	0,45	39	61
5,0	0,45	32	68
6,0	0,45	0	100
7,0	0,45	0	100
8,0	0,45	65	35

2.2.10 Quantitative allel-spezifische PCR Analyse

Die quantitative allel-spezifische PCR Analyse wurde zur Detektion von sehr niedrigen Allelfrequenzen der G143A Mutation in Feldmischproben von *Plasmopara viticola* etabliert.

2.2.10.1 Kalibrationsstandards

Zur Herstellung genomischer Kalibrationsstandards wurden zunächst die beiden phänotypisch charakterisierten Standardisolate 59 (QoI sensitiv) und 463 (QoI resistent) auf Weinblättern vermehrt. Um die Gefahr einer Verschleppung von Sporenmaterial möglichst gering halten zu können, wurden diese beiden Isolate in verschiedenen Laborräumen bearbeitet. Ausreichende Mengen Sporenmaterial konnte produziert werden, indem mehrere Zwischenvermehrungsschritte durchgeführt wurden. Um ein späteres Nivellieren der Gesamt Cytochrom *b* Kopien in den DNA Lösungen zu vereinfachen, wurde bei beiden Standardisolaten stets auf einheitliche Infektionsstärken geachtet. Das infizierte Pflanzenmaterial wurde luftgetrocknet um eine Probentrocknung unter Routinediagnosebedingungen zu simulieren. Danach wurde das getrocknete infizierte Blattmaterial zusammen mit ca. 30-40 Glasperlen (3 mm) in 50 ml Schraubdeckeldosen gefüllt und für 3 min bei 10.000 Hz in einer Retsch Schwingmühle MM301 zerkleinert. Von 15-20 mg pulverisiertem Probenmaterial wurde mit dem NucleoSpin Plant Kit (Machery Nagel) die Gesamt DNA isoliert. Mit Hilfe des Referenz PCR Systems wurden die Konzentrationen der Cytochrom *b* Kopien in den DNA Lösungen von beiden DNA Standards miteinander verglichen und gegebenenfalls auf einheitliche Konzentrationen verdünnt.

Zur Herstellung klonierter Kalibrationsstandards wurden zunächst Fragmente aus der Cytochrom *b* Nukleotidsequenz der beiden Standardisolate 59 (sensitiv) und 463 (resistent) mit den Primern PV-D2-f und PV-D2-r amplifiziert. Die Amplikons wurden mit dem TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing nach Herstellerangaben (Invitrogen) in den Plasmidvektor pCR[®] 4-TOPO (Invitrogen) kloniert. Die Plasmide wurden anschließend mit dem High Pure Plasmid Purification[®] Kit (Roche Diagnostics) isoliert und mit der Restriktionsendonuklease *ScaI* (MBI Fermentas) linearisiert. Die geschnittenen Plasmide wurden mit einer Ethanol-fällung aufgereinigt und anschließend eine DNA Konzentrationsschätzung mit dem PicoGreen[®] dsDNA Quantitation Kit durchgeführt. Vor der Herstellung von Verdünnungsreihen wurden die Plasmid-Stammlösungen mit 10 mM Tris auf 10^7 Kopien pro μl verdünnt, was den Konzentrationen an Cytochrom *b* Kopien in den genomischen DNA Lösungen entspricht. Die Plasmid-Arbeitslösungen wurden mit dem Referenz PCR System auf einheitliche Cytochrom *b* Konzentrationen überprüft.

Tabelle 13: Pipettierschema zur Herstellung von Kalibrationsstandards für die qPCR Analyse

Stufe	resistente Allele	Pipettiervolumina
I	0%	500 μl S
II	100%	500 μl R
III	10%	50 μl R + 450 μl S
IV	1%	50 μl III + 450 μl S
V	0,1%	50 μl IV + 450 μl S
VI	0,01%	50 μl V + 450 μl S
VII	0,001%	50 μl VI + 450 μl S

S,R,3,4,5,6: genomische DNA bzw. Plasmidlösung mit resistentem oder sensitivem Allel bzw. der entsprechenden Verdünnungsstufe

Die Herstellung von genomischen und klonierten Kalibrationsstandards erfolgte nach identischen Pipettierschemata. Dabei wurden resistente Allele in einem zunehmend sensitiven Hintergrund kontinuierlich im Verhältnis 1:10 verdünnt (**Tabelle 13**). Zur Vermeidung einer Degradation der linearisierten Plasmide wurden die Verdünnungsreihen in großem Maßstab hergestellt, in entsprechend niedrige Volumina aliquotiert und jedes Aliquot bis zur Verwendung als Kalibrationsstandard nur ein einziges Mal eingefroren und aufgetaut.

2.2.10.2 Plasmid Quantifizierung

Die Konzentrationsbestimmung von zirkulären sowie von linearisierten Plasmiden wurde mit dem PicoGreen® dsDNA Quantitation Kit nach Herstellerangaben durchgeführt (Molecular Probes). Die Konzentrationen der Plasmidlösungen wurden vorab über ein Agarosegel grob geschätzt. Anschließend wurden die Plasmide für die PicoGreen® Messung auf eine Konzentration von ca. 0,1 - 1,0 ng/µl verdünnt. Als Kalibrationsstandard für die Quantifizierung diente eine Verdünnungsreihe ungeschnittener Lambda DNA mit 0,1 / 0,2 / 0,4 / 0,8 und 1,6 ng/µl. Die Proben wurden für 5 min mit dem PicoGreen® Reagenz in einer Mikrotiterplatte inkubiert. Anschließend wurde die Emission von dieser Mischung bei 520nm auf einem STORM™ (Molecular Dynamics) Flourescenzmager mit der ImageQuant (Molecular Dynamics) Software bei einer PMT Spannung von 1000 V gemessen. Zur Ergebnisabsicherung wurden die Plasmidkonzentrationen doppelt in zwei unabhängigen Messreihen bestimmt.

2.2.10.3 Oligo Design zur Allel-Diskriminierung nach dem ARMS-System

Das Primer- und Sondendesign erfolgte mit der Primer Express® Software V1.5 (Applied Biosystems) nach den Amplikon Design Richtlinien von Applied Biosystems. Zur Detektion der G143A Mutation wurde eine quantitative PCR Analyse in Kombination mit einem allel-spezifischen ARMS Primer (Amplification Refractory Mutation System; NEWTON et al. 1989) eingerichtet. Bei der Konstruktion des ARMS Primers wurde nach dem MAMA Prinzip am 3'-1 terminalen Nukleotid eine zusätzliche Basenfehlpaarung eingeführt (Mismatch Amplification Mutation Assay, CHA et al. 1992, **Abbildung 10**). Dadurch sollte die allelische Differenzierung der SNP Allele über einen weiten Konzentrationsbereich ermöglicht werden. Neben dem Primer-Sonden System zur Quantifizierung resistenter Allele wurde ein Referenz PCR System zur Erfassung der Gesamt Cytochrom *b* Kopienzahlen 89 bp strangabwärts vom ARMS PCR System konstruiert. Die Detektion der amplifizierten PCR Produkte erfolgte durch die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten sequenzspezifischen Hybridisierungssonden.

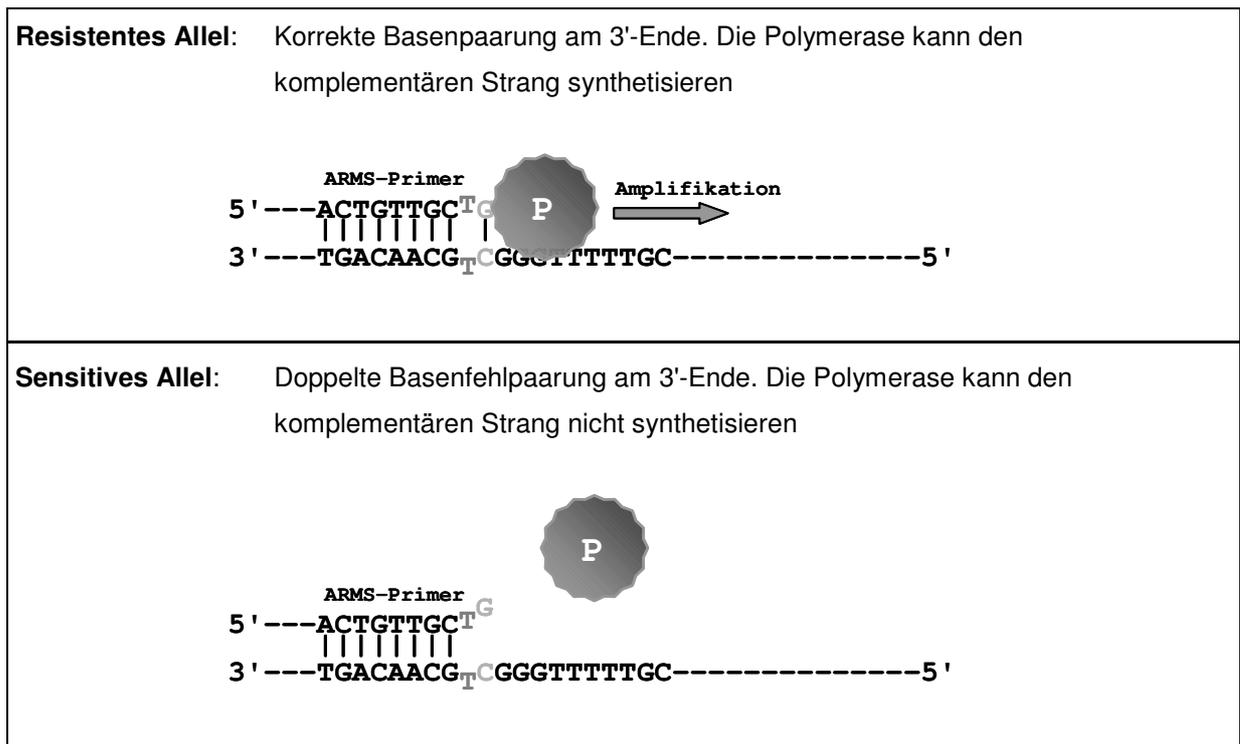


Abbildung 10: Schematische Darstellung der ARMS-MAMA Technik zur Diskriminierung der G143A SNP Allele bei *Plasmopara viticola*

Am 5'-Terminus besaß die Sonde des ARMS Systems eine Markierung mit dem Reporterfarbstoff FAM und die Sonde des Referenz Systems eine Markierung mit dem Reporterfarbstoff VIC. Beide Sonden wiesen am 3'-Ende ein nicht fluoreszentes Quencher-molekül auf (Dark Quencher). Zusätzlich zur Markierung befand sich am 3'-Ende der beiden Sonden eine 'Minor Groove Binder Gruppe' (MGB), die mit einzelsträngiger DNA eine extrem stabile Bindung eingeht (KUTYAVIN et al. 2000). Durch diesen Mechanismus kann eine Sonde bei niedriger Schmelztemperatur sehr kurz konstruiert werden. Mit den kurzen PCR Amplikons sollten möglichst hohe Amplifikationseffizienzen erreicht werden.

2.2.10.4 PCR Assay und Produktanalyse

Die quantitative 'real-time' PCR wurde auf einem ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems) durchgeführt. Alle PCR Oligonukleotide und der TaqMan® Universal PCR Master Mix mit dem passiven Referenzfarbstoff ROX wurden zur Vermeidung von DNA Kontaminationen unter einer Sterilbank pipettiert und auf ABI PRISM™ Optical Caps bzw. Optical 96-well Reaction Plates (PE Applied

Biosystems) verteilt. Die Template DNA wurde anschließend in einem anderen Raum in die Reaktionsansätze hinein pipettiert.

Tabelle 14: Parameter der qPCR für das ARMS- und das Referenzsystem bei *Plasmopara viticola*

PCR Ansatz		Amplifikation	
TaqMan® Universal			
PCR Master Mix	1x	50 °C	2 min
Primer Forward	0,9 µM	95 °C	10 min
Primer Reverse	0,9 µM	95 °C	15 s
MGB-Sonde	0,2 µM	61 °C	1 min
DNA	3,0 µl		
	ad 25,0 µl		

Zur Detektion der G143A Mutation in Feldisolaten wurde sowohl das ARMS, als auch das Referenz PCR System bei jedem Analysenlauf in drei separaten Ansätzen wiederholt. Bei den qPCR Analysen zur Berechnung von Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen wurden fünf Wiederholungen je PCR System durchgeführt. Bei jeder qPCR Analyse wurden für beide PCR Systeme Negativkontrollen ohne Template DNA mitgeführt, um DNA Kontaminationen in den Reaktionsmastermixen ausschließen zu können. Jede Analyse umfasste grundsätzlich 50 PCR Zyklen. Die Messung der Fluoreszenz-Emissionssignale in Echtzeit erfolgte mit der ABI PRISM™ Sequence Detection System V1.7 Software. Nach der PCR wurden die Amplifikationsplots visuell auf Ausreißer überprüft und diese gegebenenfalls aus den Datenreihen entfernt. Anschließend wurden die in Vorexperimenten ermittelten optimalen Baseline- und Schwellenwerte definiert. Die daraus resultierenden Ct-Werte wurden in eine Ergebnisdatei exportiert und zur weiteren Verrechnung in ein Tabellenkalkulationsprogramm übertragen.

2.2.10.5 Vergleich der Amplifikationskinetik von PCR Systemen

Nach den 'Richtlinien zur Optimierung einer TaqMan® PCR' (Applied Biosystems) müssen bei einer Quantifizierungsstrategie mit zwei PCR Ansätzen beide Systeme eine identische Amplifikationskinetik aufweisen. Zur Erfassung der dabei relevanten Parameter wurden Verdünnungsreihen genomischer DNA vom resistenten Standardisolat 463 mit Wasser hergestellt und mit dem ARMS und dem Referenz PCR System amplifiziert. Weil bei einer PCR praktisch niemals tatsächlich eine Verdopplung der Reaktionsprodukte pro Zyklus erreicht wird, stellt die Effizienz der Amplifikation eine wichtige Kenngröße der Amplifikationskinetik dar. Bei einer Quantifizierungsstrategie mit zwei PCR Systemen müssen beide Reaktionen nahezu identische Effizienzen über mindestens fünf Verdünnungsstufen hinweg aufweisen. Die PCR Effizienz wird nach RASMUSSEN (2001) aus der Steigung der Kalibrationsgeraden mit folgender Formel errechnet:

$$E = 10^{-1/b} - 1 \quad (1)$$

E = Effizienz der Amplifikation

b = Steigung der Kalibrationsgeraden

Zur Prüfung der Linearität wurde die relative Effizienz der beiden PCR Systeme zueinander berechnet. Auf jeder Verdünnungsstufe wurden die Ct-Werte beider Systeme zunächst voneinander subtrahiert. Diese Δ Ct-Werte wurden gegen den log10 der relativen Konzentration aufgetragen und danach die Steigung der Regressionsgeraden ermittelt. Linearität zwischen beiden PCR Systemen herrscht, wenn der absolute Wert der Steigung dieser Regressionsgeraden $<0,1$ beträgt.

In den 'Richtlinien zur Optimierung einer TaqMan® PCR' wird neben einer einheitlichen Amplifikationskinetik eine hohe Präzision der Kalibrierfunktionen gefordert. Die Bestimmtheitsmaße der Regressionsgleichungen aller beteiligter PCR Systeme müssen bei einem zulässigen Quantifizierungsverfahren einen Wert von mindestens 0,95 erreichen.

2.2.10.6 Quantifizierung resistenter Allele

Von jeder Kalibrationsstufe wurde die Differenz der gemittelten ARMS und der gemittelten Referenz Ct-Werte berechnet. Diese ΔCt -Werte wurden gegen den \log_{10} der relativen Konzentration resistenter Allele bei den genomischen Verdünnungsreihen (100% - 0,001%), bzw. gegen den \log_{10} der absoluten Kopienzahl resistenter Allele bei Plasmid Verdünnungsreihen aufgetragen. Von dieser linearen Regression wurden der Achsenabschnitt, die Steigung und das Bestimmtheitsmaß sowie die Gesamt PCR Effizienz des Systems errechnet. Durch Einsetzen der ΔCt -Werte von anonymen Proben in die Kalibrierfunktion gelangt man zum Quantifizierungsergebnis.

$$y = 10^{\frac{\Delta Ct - a}{b}} \quad (2)$$

- y = Anteil resistenter Allele in der DNA Lösung
- ΔCt = $MW(Ct\ ARMS) - MW(Ct\ Referenz)$
- a = Achsenabschnitt der Regressionsgeraden
- b = Steigung der Kalibrationsgeraden

2.2.10.7 Validierungsparameter des qPCR Systems

Mit den Ct-Werten des ARMS und des Referenz Systems wurden Dixon Ausreißer-
tests nach DIN 53804-1 (DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMIERUNG, 2002) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,1$ bei zweiseitiger Abgrenzung durchgeführt. Bei den Ct-Werten der Leerproben erfolgte der Dixon Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ bei einseitiger Abgrenzung. Mit den Ct-Werten einer kompletten PCR Platte wurde ein Kolmogorov-Smirnov Test auf Normalverteilung (GRAF et al. 1997) durchgeführt. Zur Normalisierung der Daten wurden dabei alle Ct-Werte vom arithmetischen Mittel der jeweiligen Verdünnungsstufe subtrahiert.

Die Vertrauensbereiche (VB) der ΔCt -Werte aller Kalibrationsstufen wurden nach DIN 53804-1 mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ und zweiseitiger Abgrenzung nach folgender Gleichung berechnet:

$$W = \frac{SD \times t_{df;\alpha/2}}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

$$VB = \Delta Ct \pm W \quad (4)$$

- W* = halbes Prognoseintervall für eine Kalibrationsstufe
VB = Vertrauensbereich der ΔCt -Werte einer Kalibrationsstufe
 ΔCt = $MW(Ct \text{ ARMS}) - MW(Ct \text{ Referenz})$
SD = Standardabweichung aller $Ct \text{ ARMS} - MW(Ct \text{ Referenz})$
 $t_{df;\alpha/2}$ = Tabellenwert der t -Verteilung mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ und $df=n-1$ Freiheitsgrade
n = Anzahl der Wiederholungen einer Kalibrationsstufe

Der Vertrauensbereich für den Ct -Wert einer Verdünnungsstufe hat demnach die Weite des zweifachen Prognoseintervalls ($2 W$). Mit diesen Werten wurden die Vertrauensbereiche der Quantifizierungsergebnisse durch Einsetzen in die Kalibrierfunktion berechnet.

Die Berechnung des Vertrauensbereichs des Leerwertes (0% resistente Allele) erfolgte nach DIN 53804-1 mit einseitiger Abgrenzung bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$:

$$W_L = \frac{SD \times t_{df;\alpha}}{\sqrt{n_L}} \quad (5)$$

$$VB_L = \Delta Ct_L - W_L \quad (6)$$

- W_L = Prognoseintervall des Leerwerts
 VB_L = Vertrauensbereich der ΔCt -Werte des Leerwerts
 ΔCt_L = $MW(Ct \text{ ARMS}) - MW(Ct \text{ Referenz})$ des Leerwerts
SD = Standardabweichung aller $Ct \text{ ARMS} - MW(Ct \text{ Referenz})$ des Leerwerts
 $t_{df;\alpha}$ = Tabellenwert der t -Verteilung mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ und $df=n_L-1$ Freiheitsgrade
 n_L = Anzahl der Wiederholungen des Leerwerts

Der Vertrauensbereich für den Ct -Wert der Leerprobe hat die Weite des einfachen Prognoseintervalls (W_L). Die Grenze des einseitigen Vertrauensbereichs des Leerwertes markiert den Ct -Wert, ab dessen Unterschreitung in mehr als der Hälfte aller

Fälle tatsächlich resistente Allele in der DNA Lösung detektiert werden. Zur Berechnung der Nachweisgrenze aus der Messung an den Leerproben wird nach DIN 32645 der Vertrauensbereich des Leerwertes in die Kalibrierfunktion eingesetzt:

$$y_{NG} = 10^{\frac{(VB_L)-a}{b}} \quad (7)$$

- y_{NG} = Nachweisgrenze in absoluten Kopien
 VB_L = Vertrauensbereich des Leerwertes
 a = Achsenabschnitt der Kalibrierfunktion
 b = Steigung der Kalibrierfunktion

Die Schwelle, ab der sich der Vertrauensbereich des Analysenergebnisses gerade nicht mehr mit dem Vertrauensbereich des Leerwertes überlagert, wird als Erfassungsgrenze bezeichnet. Ab diesem Messergebnis können mit einer gegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit zuverlässig resistente Allele detektiert werden. Nach DIN 32645 erhält man die Erfassungsgrenze durch Einsetzen des Mittelwerts der Leerprobe plus doppeltem einseitigem Prognoseintervall in die Kalibrierfunktion:

$$y_{EG} = 10^{\frac{(\Delta Ct_L - 2 \times W_L) - a}{b}} \quad (8)$$

- y_{EG} = Erfassungsgrenze in Kopienzahlen
 ΔCt_L = $MW(Ct \text{ ARMS}) - MW(Ct \text{ Referenz})$ des Leerwertes
 W_L = Prognoseintervall des Leerwertes
 a = Achsenabschnitt der Kalibrierfunktion
 b = Steigung der Kalibrierfunktion

Da resistente Allele nur quantifizierbar sind, wenn sie auch nachweisbar sind, ist die Bestimmungsgrenze höher als die Erfassungsgrenze. Die Vertrauensbereiche der Erfassungs- und der Bestimmungsgrenze bei einer gegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit dürfen sich also gerade nicht mehr überlagern. Nach einer Empfehlung der DIN 32645 soll die relative Ergebnisunsicherheit der Bestimmungsgrenze ($1/k$) (halbe Breite des Prognoseintervalls dividiert durch die Bestimmungsgrenze) 33,3% betragen. Nach DIN 32645 erhält man eine gute Näherung für die Bestimmungsgrenze

durch Einsetzen des Mittelwerts der Leerprobe plus einseitiges Prognoseintervall multipliziert mit k in die Kalibrierfunktion:

$$y_{BG} = 10^{\frac{(\Delta Ct_L - k \times W_L) - a}{b}} \quad (10)$$

- y_{BG} = Erfassungsgrenze in Kopienzahlen
- ΔCt_L = $MW(Ct_{ARMS}) - MW(Ct_{Referenz})$ des Leerwerts
- k = 3 (entsprechend einer relativen Ergebnisunsicherheit von 33,3% mit der vorgegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit)
- W_L = Prognoseintervall des Leerwerts
- a = Achsenabschnitt der Kalibrierfunktion
- b = Steigung der Kalibrierfunktion

3 Ergebnisse

3.1 Molekulare Markersysteme für QoI-Resistenz bei *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*

3.1.1 CAPS-Analyse bei *B. graminis* f.sp. *tritici*

Die Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) Analyse wurde zur Detektion der G143A Punktmutation bei *B. graminis* f.sp. *tritici* eingerichtet. Zur Validierung des CAPS Markers für QoI Resistenz beim diesem Pathogen wurde der molekulare Test an 108 phänotypisch eindeutig charakterisierten Isolaten aus Einzelsporennachkommenschaften durchgeführt. Aus der Gesamt DNA von 10 sensitiven und 98 resistenten Isolaten wurde mit dem Primersystem 14f + 3r ein 465 bp großes Fragment aus dem Cytochrom *b* Gen amplifiziert und anschließend mit dem Restriktionsenzym *Ital* allel-spezifisch hydrolysiert (**Abbildung 11**). Die Ergebnisse der molekularen Untersuchungen zeigten vollständige Übereinstimmung mit der phänotypischen Charakterisierung der 'In-Vivo'-Biotests. In der Gelelektrophorese zeigte der CAPS Marker (14f+3r)/*Ital* drei Fragmente bei resistenten und zwei Fragmente bei sensitiven Isolaten (**Abbildung 12**). Diese Ergebnisse bestätigten, dass alle 98 resistenten Isolate die G143A Punktmutation besaßen.

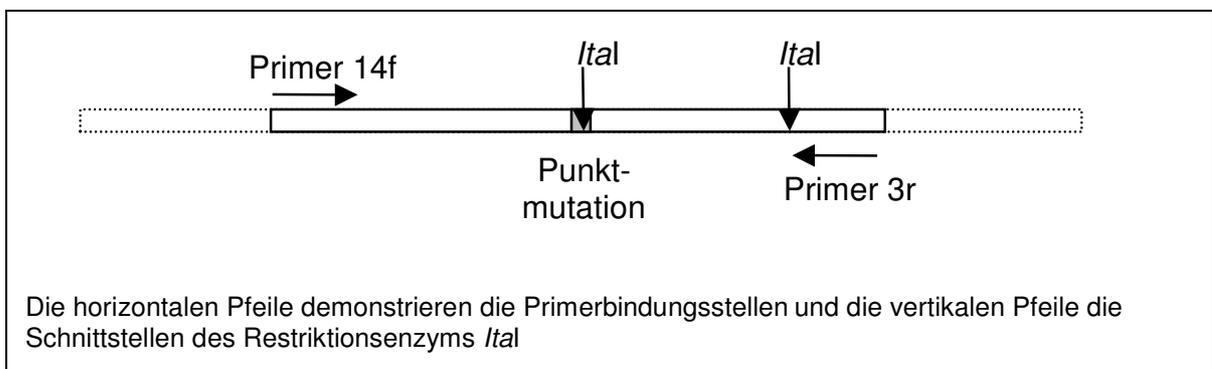


Abbildung 11: Schematische Darstellung des CAPS Markers (14f+3r)/*Ital* zur Detektion der G143A Mutation bei *B. graminis* f.sp. *tritici* und *B. graminis* f.sp. *hordei*

CAPS Analysen mit allelischen Mischungen aus PCR Produkten von sensitiven und resistenten *B. graminis* f.sp. *tritici* Isolaten dienen zur Abschätzung der Detektionsleistung resistenter Allele in Feldmischproben. Mit dem CAPS Marker (14f+3r)/*Ital* wurde an drei unabhängigen Verdünnungsreihen mit 0%, 100%, 50%, 10%, 5% und 1% resistenten Allelen gezeigt, dass die Restriktionsfragmente von Fragmenten beider Allele bei der 50% Stufe zuverlässig identifizierbar waren. Die Restriktionsfragmente der resistenten Allele waren dagegen bei der 10% Variante kaum mehr

detektierbar (**Abbildung 12**). Die Nachweisgrenze für Qol resistente Allele in Feldmischproben von *B. graminis* f.sp. *tritici* wurde deshalb auf 10-50% geschätzt.

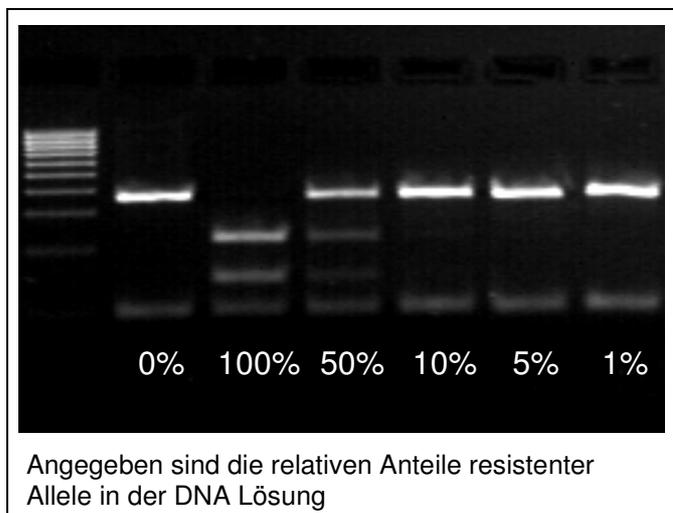


Abbildung 12: *Ital* CAPS Marker zur Detektion der G143A Mutation bei *B. graminis* f.sp. *tritici*

Gesondert wurde mit dem CAPS Marker (14f+3r)/*Ital* nach heteroplasmatischen *B. graminis* f.sp. *tritici* Isolaten gesucht. Für diese Untersuchungen wurden 95 phänotypisch charakterisierte sensitive Isolate ausgewählt, die aus Regionen stammten, in denen bereits ein sehr hoher Anteil von Qol Resistenz anzutreffen war. Mit dieser Auswahl sollte die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, mitochondriale Mischtypen zu identifizieren. Als Positivkontrolle wurden 10 resistente Isolate mitgeführt. Die visuelle Auswertung der Restriktionsfragmente bestätigte die exakte Übereinstimmung mit den phänotypischen Ergebnissen aus den Biotests. Heteroplasmatische Genotypen wurden nicht identifiziert.

3.1.2 AS-PCR bei *B. graminis* f.sp. *tritici*

Zur Detektion der G143A Mutation bei *B. graminis* f.sp. *tritici* wurde ein allelspezifischer PCR Marker eingerichtet. Nach einer Optimierung der PCR Annealingtemperaturen eines Nested PCR Ansatzes (**Abbildung 13**) konnte die erforderliche Präzision bei der allelischen Diskriminierung erreicht werden.

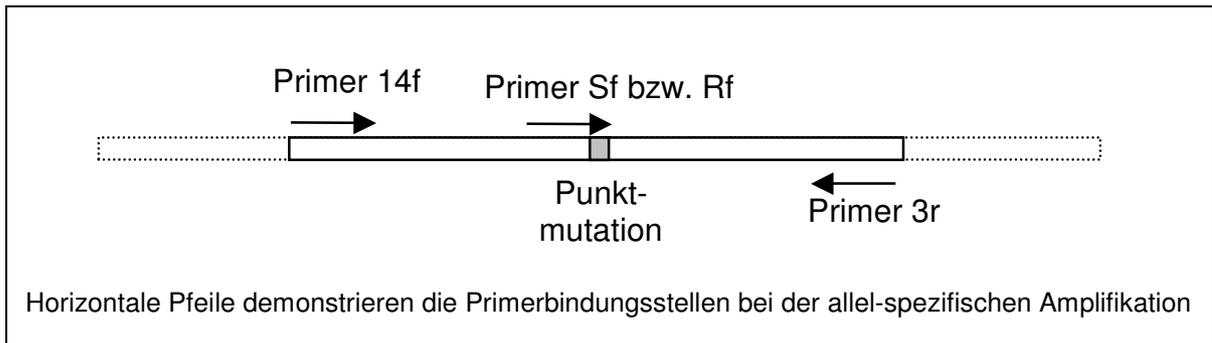


Abbildung 13: Schematische Darstellung des allel-spezifischen PCR Markers 14f+3r+Sf bzw. 14f+3r+Rf zur Detektion der G143A Mutation bei *B. graminis* f.sp. *tritici*

Mit der Primerkombination 14f+3r+Sf wurden aus der DNA von resistenten Isolaten ein Fragment, mit der Primerkombination 14f+3r+Rf zwei Fragmente amplifiziert. Sensitive Isolate resultierten in komplementären Bandenmustern (**Abbildung 14**).

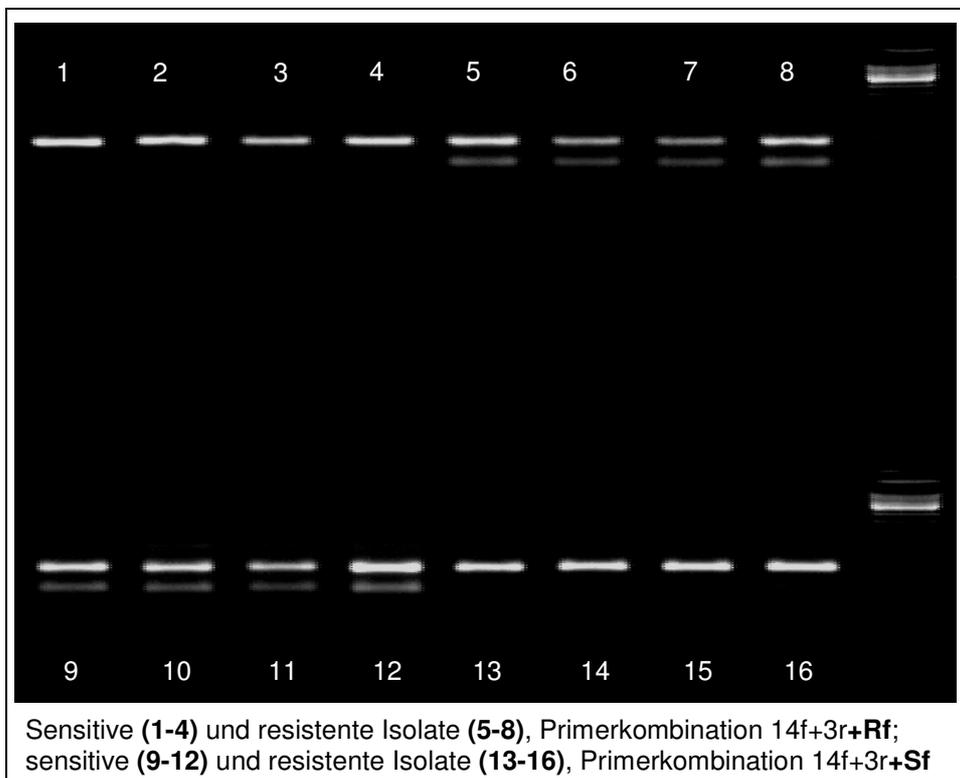


Abbildung 14: Allel-spezifische Amplifikation aus dem Cytochrom *b* Gen von *B. graminis* f.sp. *tritici*

Bei der AS-PCR wurde ein sehr enger Temperaturbereich des PCR Annealing Schrittes von 60°C für eine zuverlässige allelische Diskriminierung ermittelt. Außerhalb dieses Optimums erreichte die allel-spezifische Amplifikation nur eine geringe Sensitivität. Eine Übertragung dieses Diagnosesystems auf andere PCR Thermocycler ist nur durch erneute Etablierung der Amplifikationsparameter möglich.

Zur Validierung des Markersystems wurden 37 phänotypisch charakterisierte *B. graminis* f.sp. *tritici* (8 sensitiv, 29 resistent) aus Einzelsporennachkommenschaften analysiert. Ebenso wie bei den CAPS Analysen wurden bei der allel-spezifischen Amplifikation die Ergebnisse aus den Biotests zuverlässig bestätigt. Mit Verdünnungsreihen aus PCR Produkten von sensitiven und resistenten Standardisolaten konnte mit dem allel-spezifische PCR Marker keine zuverlässige Detektion resistenter Allele in den Mischungen erfolgen. Bereits bei einem relativen Anteil von 50% resistenter Allele konnte das diagnostische kürzere Fragment kaum mehr auf dem Agarosegel identifiziert werden. Aufgrund der ungünstigen quantitativen Detektionsleistung wurden mit diesem Markersystem keine Untersuchungen zur Identifikation von heteroplasmatischen Genotypen durchgeführt.

3.1.3 DHPLC Analyse bei *B. graminis* f.sp. *tritici*

Für die DHPLC Analyse zur Detektion der G143A Mutation bei *B. graminis* f.sp. *tritici* wurde vorab ein 465 bp großes Fragment aus dem Cytochrom *b* Gen mit den Primern 14f und 3r amplifiziert. Die mit dem 3x SDS Verfahren gewonnene Gesamt DNA aus infizierten Weizenblättern besaß ausreichende Qualität für eine erfolgreiche Amplifikation. Aufgrund durchgehend einheitlicher Konzentrationen der PCR Produkte aller Isolate konnten äquimolare Mischungen der Amplikons von Wildtyp- und anonymen Isolaten einfach hergestellt werden. Die optimale Auftrennung der Homo- und Heteroduplexe bei der DHPLC Analyse erfolgte mit einem linearen Standardgradienten bei einer Säulentemperatur von 58 °C. Die Validierung der qualitativen Detektionsleistung dieses Markersystems mit 48 phänotypisch charakterisierten *B. graminis* f.sp. *tritici* Isolaten (21 sensitiv, 27 resistent) zeigte vollständige Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den Biotests. Zur Beurteilung der quantitativen Detektionsleistung resistenter Allele in Feldmischproben wurden Verdünnungsreihen aus PCR Produkten mit relativen Anteilen resistenter Allele von 50%, 40%, 30%, 20%, 10% und 5% analysiert. Bei der visuellen Evaluierung der Elutionsprofile konnte bei einem relativen Anteil von 20% resistenter Allele in der Mischung der Heteroduplexpeak eindeutig und reproduzierbar identifiziert werden (**Abbildung 15**). Unterhalb dieser Stufe resultierte die Elution der Heteroduplexe lediglich in einem Schulterpeak auf dem Homoduplexpeak. Diese schwachen Signale konnten aufgrund mangelhafter Reproduzierbarkeit nicht mehr als diagnostische Peaks gewertet werden. Sämtliche

Elutionsprofile bei der DHPLC Analyse wiesen ein hohes, schlecht zu definierendes Grundrauschen und kohärente Flächen von Homo- und Heteroduplexpeaks auf. Eine Quantifizierung resistenter Allele anhand der Höhe oder Fläche der Heteroduplexpeaks konnte deshalb nicht durchgeführt werden.

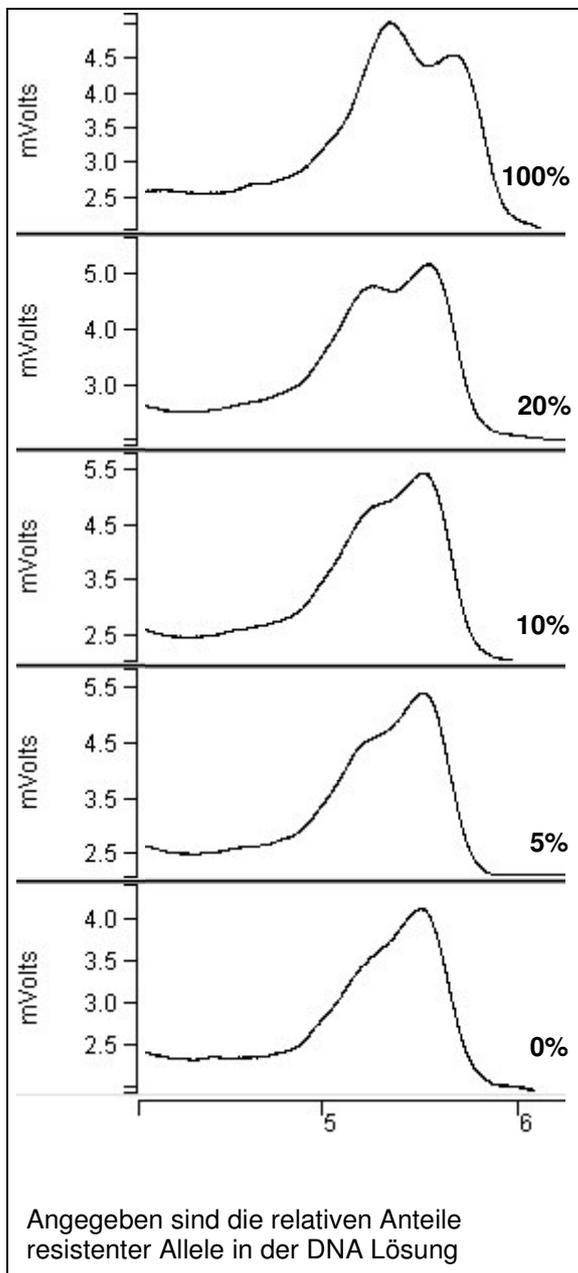


Abbildung 15: *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*: Ermittlung der Detektionsgrenze resistenter Allele bei der DHPLC Analyse

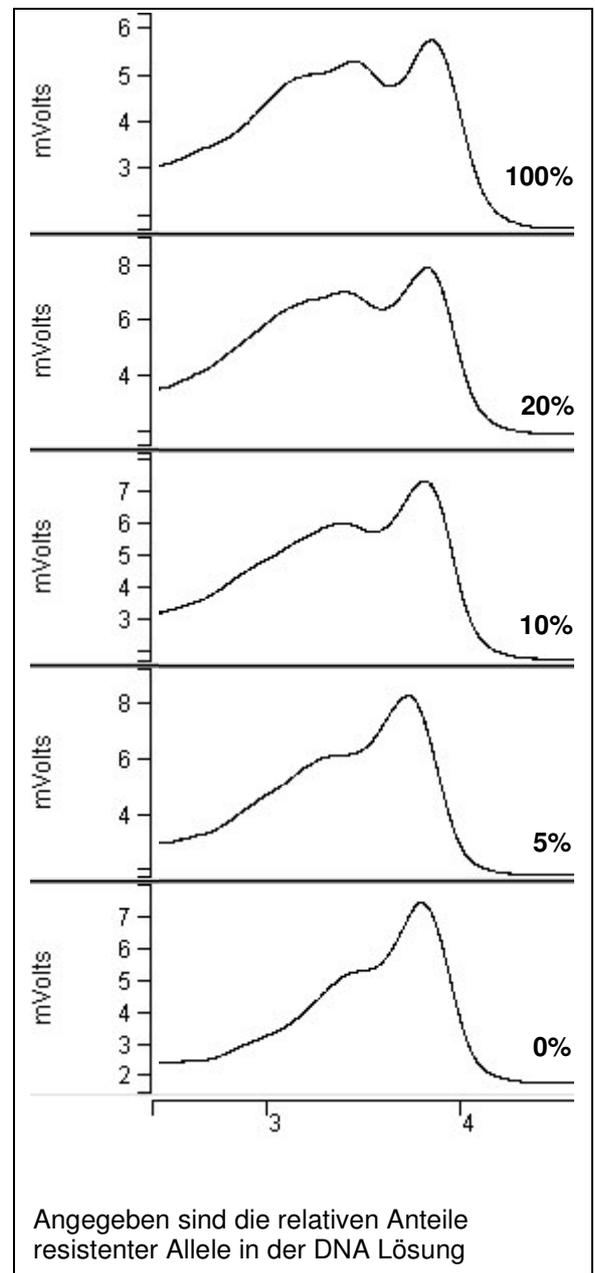


Abbildung 16: *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*: Ermittlung der Detektionsgrenze resistenter Allele bei der DHPLC Analyse

3.2 Molekulare Markersysteme für QoI-Resistenz bei *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*

3.2.1 Sequenzanalyse bei *B. graminis* f.sp. *hordei*

Mit den Cytochrom *b* spezifischen Primern 14f und 3r von *B. graminis* f.sp. *tritici* konnte auch bei *B. graminis* f.sp. *hordei* ein 465 bp großes PCR Fragment amplifiziert werden. Die Amplikons von fünf phänotypisch resistenten und fünf sensitiven *B. graminis* f.sp. *hordei* Isolaten aus unterschiedlichen Regionen Europas wurden kloniert und anschließend eine Sequenzanalyse durchgeführt.

	WM-Cb-f →	Cytb-f	
<i>E.g. tritici</i>	GCGGGATGTTAATAACGGATGATTAATACGTTACATACACTCAAACACAGCTTCAGCTTT		60
<i>E.g. hordei</i>	GCGGGATGTTAATAACGGATGATTAATACGTTACATACACTCAAACACAGCTTCAGCTTT		60

	→		
<i>E.g. tritici</i>	CTTTTCTTAGTTTATTTACATATAGGTAGAGGTTTATATTACGGATCATATAGAGCACC		120
<i>E.g. hordei</i>	CTTTTCTTAGTTTATTTACATATAGGTAGAGGTTTATATTACGGATCATATAGAGCACC		120

<i>E.g. tritici</i>	AAGAACATTAGTTTGAACAATAGGTACAGTAATATTCATATTAATGATCGTTACTGCATT		180
<i>E.g. hordei</i>	AAGAACATTAGTTTGAACAATGGTACAGTAATATTCATATTAATGATCGTTACTGCATT	*	180

		ItaI	
<i>E.g. tritici</i>	CCTGGGTTATGTATTGCCATACGGGCAGATGAGCCACTGGGCTGCAACCGTTATCACTAA		240
<i>E.g. hordei</i>	CCTGGGTTATGTATTGCCATACGGGCAGATGAGCCACTGGGCTGCAACCGTTATCACTAA		240

<i>E.g. tritici</i>	CCTAATGAGCGCTATAACCATGAATAGGACAAGATATTGTGGAGTTCCTTTGAGGAGGTTT		300
<i>E.g. hordei</i>	CCTAATGAGCGCTATAACCATGAATAGGACAAGATATTGTGGAGTTCCTTTGAGGAGGTTT		300

<i>E.g. tritici</i>	CTCTGTAAATAATGCAACGTTAAACAGATTCTTTGCTTTACACTTTGTCTTGCCGTTTCGT		360
<i>E.g. hordei</i>	CTCTGTAAATAATGCAACGTTAAACAGATTCTTTGCTTTACACTTTGTCTTGCCGTTTCGT		360

	ItaI	Cytb-r ←	
<i>E.g. tritici</i>	TTTAGCTGCTTTAGCTTTAATGCACTTAATAGCACTTCACGATAGTGCAGGATCTGGTAA		420
<i>E.g. hordei</i>	TTTAGCTGCTTTAGCTTTAATGCACTTAATAGCACTTCACGATAGTGCAGGATCTGGTAA		420

		WM-Cb-r ←	
<i>E.g. tritici</i>	TCCTTTAGGTGTTTCAGGTAATTACGATAGATTACCTATGGCTCC		465
<i>E.g. hordei</i>	TCCTTTAGGTGTTTCAGGTAATTACGATAGATTACCTATGGCTCC		465

Primerbindungsstellen sind durch Pfeile, Schnittstellen von *ItaI* durch horizontale Linien dargestellt. Der Sequenzunterschied zwischen den beiden *Blumeria graminis* Rassen ist durch einen Stern markiert. Die Position der G143A Mutation, die Resistenz gegenüber QoI Fungizide verleiht, ist schwarz eingefasst.

Abbildung 17: Alignment einer Teilsequenz des Cytochrom *b* Gens von *B. graminis* f.sp. *tritici* und *B. graminis* f.sp. *hordei*

Ein DNA Sequenzabgleich der partiellen Cytochrom *b* Nukleotidsequenzen von *B. graminis* f.sp. *tritici* und *B. graminis* f.sp. *hordei* offenbarte sehr starke Sequenzhomo-

logie (**Abbildung 17**). Innerhalb des beobachteten 465 bp großen Fragmentes wurde zwischen den beiden *B. graminis* Rassen nur eine A-T Transversion ausgemacht.

3.2.2 CAPS-Analyse bei *B. graminis* f.sp. *hordei*

Bei der Sequenzanalyse des Cytochrom *b* Gens QoI sensitiver und resistenter *B. graminis* f.sp. *hordei* Isolate wurde ebenfalls eine Punktmutation identifiziert, die für einen G143A Aminosäureaustausch verantwortlich ist. Durch den SNP wird auch bei diesem Pathogen eine zusätzliche Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Ital* in den amplifizierten Fragmenten des Cytochrom *b* Gens geschaffen. Deshalb konnte auch bei *B. graminis* f.sp. *hordei* der CAPS Marker (14f+3r)/*Ital* zur Detektion der G143A Mutation angewandt werden. Aufgrund der nahezu identischen Cytochrom *b* Nukleotidsequenzen der beiden untersuchten *B. graminis* Rassen zeigte der CAPS Marker (14f+3r)/*Ital* bei *B. graminis* f.sp. *hordei* ebenfalls zwei Fragmente bei sensitiven und drei Fragmente bei resistenten Isolaten (**Abbildung 12**). Die Validierung der CAPS Analyse erfolgte mit 107 sensitiven und 11 resistenten Einzelsporenisolaten aus ausgewählten Regionen Europas. Die Ergebnisse der molekularen Tests bestätigten wiederum die zuvor durchgeführte phänotypische Charakterisierung. In allen untersuchten Isolaten war die G143A Mutation also für die QoI Resistenz verantwortlich. Genauso wie bei *B. graminis* f.sp. *tritici* konnten bei diesen Untersuchungen keine mitochondrialen Mischtypen identifiziert werden. Die visuelle Auswertung der Verdünnungsreihen von PCR Produkten resistenter Allele in einem sensitiven Hintergrund ergab eine Nachweisgrenze für QoI resistente Allele in Feldmischproben in einem Bereich von 10-50%.

3.2.3 DHPLC-Analyse bei *B. graminis* f.sp. *hordei*

Für eine schnelle und kostengünstige Routinediagnostik zur Detektion von QoI Resistenz wurde die DHPLC Analyse auch für *B. graminis* f.sp. *hordei* eingerichtet. Mit den Primern BG-Cytb-f und BG-Cytb-r wurde zunächst ein 357 bp großes Fragment aus dem Cytochrom *b* Gen amplifiziert. Die Nukleinsäureaufarbeitung mit dem 3x SDS Verfahren lieferte bei diesem Pathogen DNA in ausreichender Qualität und Quantität, wodurch einheitliche Konzentrationen bei den PCR Amplikons erzielt wurden. Eine optimale Auftrennung der Homo- und Heteroduplexe erfolgte unter einem

linearen Standardgradienten bei einer Ofentemperatur von 58°C Die DHPLC Analyse von 29 sensitiven und 11 resistenten Isolaten bestätigte die phänotypische Charakterisierung aus den Biotests. Mit Verdünnungsreihen von PCR Produkten resistenter Isolate in einem sensitiven Hintergrund wurde eine Detektionsgrenze von 20% resistenter Allele für die Analyse von Feldmischproben ermittelt (**Abbildung 16**).

3.3 Molekulare Markersysteme für QoI-Resistenz bei *Venturia inaequalis*

Die Konstruktion Cytochrom *b* spezifischer PCR Primer bei *Venturia inaequalis* erfolgte anhand der in der EMBL-Gendatenbank (www2.ebi.ac.uk) publizierten vollständigen Cytochrom *b* Nukleotidsequenz von diesem Pathogen (Akzessionsnummer EMBL: AF004559). Mit standardisierten Nukleinsäureaufreinigungsverfahren, genauso wie mit kommerziell erhältlichen DNA Isolationskits konnte aus getrockneten infizierten Apfelblättern keine DNA in ausreichender Qualität und Quantität gewonnen werden, um damit eine PCR gestützte Analysenmethode durchführen zu können. Infolgedessen wurde das Isolationsprotokoll des NucleoSpin Plant Kit (Machery Nagel) modifiziert. Nach einer intensivierten Probenzerkleinerung, einer auf 14 Stunden verlängerten Inkubation des zerkleinerten Pflanzenmaterials mit dem Isolationspuffer, sowie einer dreifach wiederholten Waschung der an die Säulchenmembran gebundenen Nukleinsäuren mit dem Waschpuffer CW konnte schließlich DNA in ausreichender Qualität und Quantität isoliert werden. Mit der Gesamt DNA aus infizierten Apfelblättern erfolgte schließlich die Amplifikation der für die QoI Resistenzanalyse relevanten Cytochrom *b* Fragmente von *Venturia inaequalis* in ausreichend hoher und einheitlicher Quantität.

3.3.1 CAPS-Analyse bei *V. inaequalis*

Mit den PCR Primern VI-het-f und VI-het-r wurde ein 460 bp großes Fragment aus dem Cytochrom *b* Gen von *Venturia inaequalis* amplifiziert. Eine Sequenzanalyse dieses DNA Abschnittes von vier QoI resistenten und vier QoI sensitiven *Venturia inaequalis* Isolaten aus Einzelsporennachkommenschaften bestätigte eine Punktmutation, die den G143A Aminosäureaustausch im Cytochrom *b* Protein verursacht und deshalb *Venturia inaequalis* Resistenz gegenüber QoI Fungizide verleiht. Dieser SNP schafft auch bei *Venturia inaequalis* eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym

Ital, weshalb auch bei diesem Pathogen eine CAPS-Analyse zur Resistenzdiagnostik etabliert werden konnte. Innerhalb des mit den PCR Primern VI-het-f und VI-het-r amplifizierten Cytochrom *b* Abschnittes existierte keine weitere Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Ital*. Nach der allel-spezifischen Hydrolyse der PCR Amplikons konnten die Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt und visuell ausgewertet werden. Der CAPS Marker lieferte ein ungeschnittenes PCR Produkt bei sensitiven Isolaten, während Amplikons von resistenten Isolaten in zwei entsprechend kürzere Restriktionsfragmente hydrolysiert wurden (**Abbildung 18**). Die Validierung des Markers erfolgte durch die Analyse von 41 europaweit ausgewählten *Venturia inaequalis* Isolaten (9 resistent, 32 sensitiv) aus Einzelsporennachkommenschaften. Die molekularen Ergebnisse stimmten mit den phänotypischen Bonituren aus den 'In vivo' Biotests vollkommen überein. Alle hier untersuchten resistenten Isolate besaßen folglich die G143A Mutation. Phänotypisch Qol resistente Isolate, die statt der G143A Mutation den in der Literatur beschriebenen selten auftretenden metabolischen Resistenzmechanismus aufweisen, befanden sich nicht unter den ausgewählten Proben. Durch die CAPS Analyse von Verdünnungsreihen aus PCR Produkten resistenter und sensibler Standardisolate wurde eine Detektionsgrenze von ca. 20% resistenter Allele in Feldmischproben von *Venturia inaequalis* geschätzt.

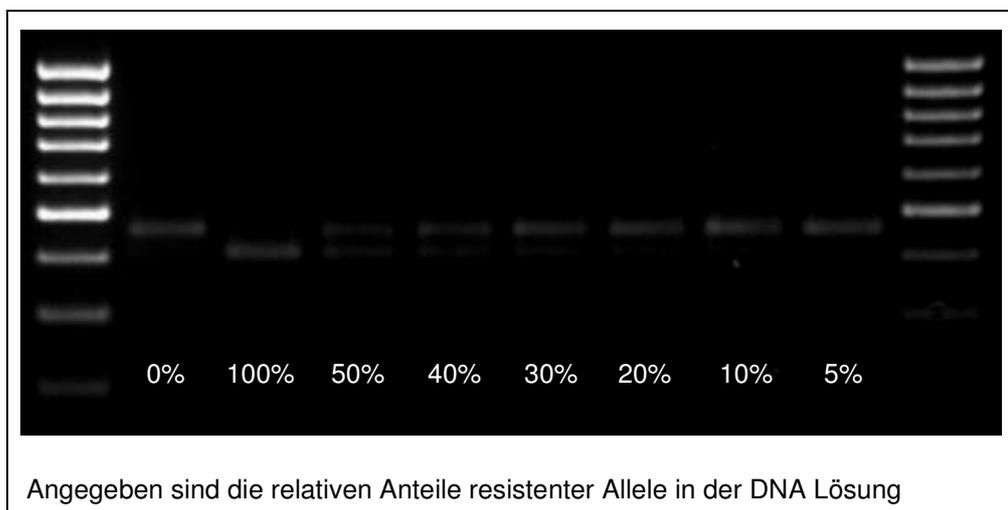


Abbildung 18: CAPS Marker zur Detektion der G143A Mutation bei *Venturia inaequalis*

3.3.2 DHPLC-Analyse bei *V. inaequalis*

Als Routinediagnosesystem für die Detektion der G143A Mutation bei *Venturia inaequalis* wurde die DHPLC Analyse eingerichtet. Dabei wurde mit den Primern VI-het-f und VI-het-r zunächst ein 460 bp großes Fragment aus dem Cytochrom *b* Gen ampli-

fiziert. Aufgrund des modifizierten DNA Isolationsverfahrens konnte auch bei Feldproben unterschiedlicher Herkunft und Qualität eine ausreichend effiziente und einheitliche Amplifikation erreicht werden. Nach dem Mixen der Amplikons von anonymen und Wildtyp Isolaten, Denaturierung und Reannealing wurden die Homo- und Heteroduplexe mit einem linearen Standardgradienten bei einer Ofentemperatur von 57°C erfolgreich aufgetrennt (**Abbildung 19**). Zur qualitativen Validierung des Markersystems wurden 35 zuvor phänotypisch charakterisierte Einzelsporenisolate (6 sensitiv, 29 resistent) analysiert. Dabei wurde vollkommene Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den Biotests festgestellt. Alle resistenten Isolate trugen demnach die G143A Mutation. Ebenso wie mit dem CAPS Marker konnte auch bei der DHPLC Analyse kein Isolat identifiziert werden, bei dem ein anderer Mechanismus für die Resistenzausprägung verantwortlich ist. Untersuchungen an Verdünnungsreihen von PCR Produkten resistenter Isolate in einem zunehmenden sensitiven Hintergrund bestätigten eine semiquantitative Detektionsleistung von 20% resistenter Allele in Feldmischproben von *Venturia inaequalis* bei der DHPLC Analyse (**Abbildung 19**).

3.4 Molekulare Markersysteme für QoI-Resistenz bei *Septoria tritici*

Für die Entwicklung eines Markers zur Detektion der G143A Mutation bei *Septoria tritici* war keine Cytochrom *b* Nukleotidsequenz von diesem Pathogen verfügbar. Basierend auf der in der EMBL Gendatenbank publizierte Cytochrom *b* Gensequenz von *Septoria fijiensis* (Akzessionsnummer EMBL: AY247413) wurden mehrere PCR Primer konstruiert, welche die G143A Mutation flankieren. In PCR Ansätzen mit genomischer DNA von *Septoria tritici* konnte mit den Primern 91f + 511r unter unspezifischen Reaktionsbedingungen (Annealingtemperatur: 49°C, MgCl₂ Konzentration: 3,5 mM) zunächst ein 315 bp großes Fragment aus dem Cytochrom *b* Gen amplifiziert werden. Dieser DNA Abschnitt wurde schließlich kloniert und eine Sequenzanalyse durchgeführt.

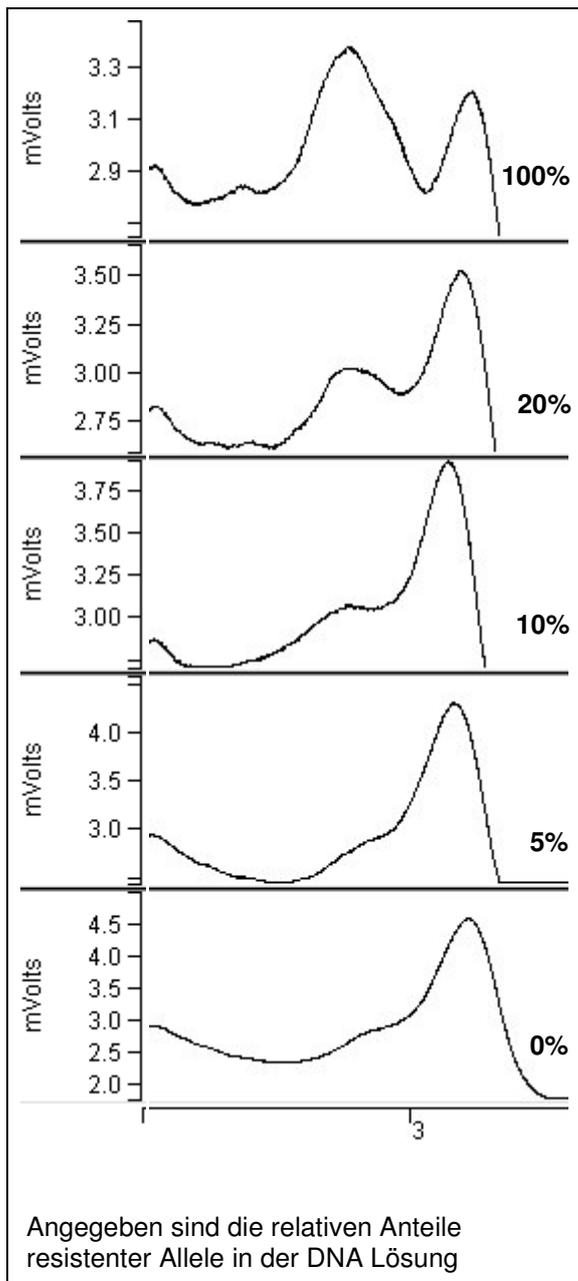


Abbildung 19: *Venturia inaequalis*: Ermittlung der Detektionsgrenze resistenter Allele bei der DHPLC Analyse

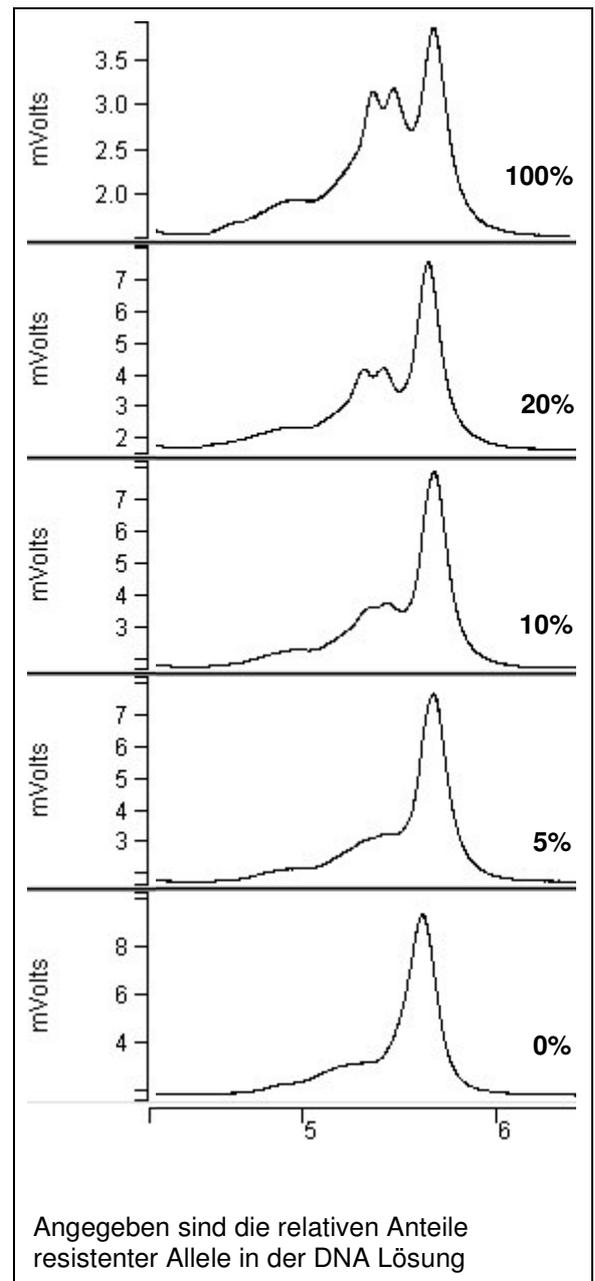


Abbildung 20: *Septoria tritici*: Ermittlung der Detektionsgrenze resistenter Allele bei der DHPLC Analyse

Der DHPLC Assay zur Detektion der G143A Mutation bei *Septoria tritici* wurde zu einem Zeitpunkt etabliert, an dem weltweit noch kein resistentes Isolat dieses Pathogens bekannt war. Deshalb wurde zunächst eine G143A Mutation mit Hilfe einer 'Site Directed Mutagenesis' durch einen entsprechenden Guanin gegen Cytosin Austausch erfolgreich in die Nukleotidsequenz eines PCR Produktes eingeführt. Die Amplikons mit dem wildtyp Allel sowie mit dem künstlich geschaffenen mutanten

Allele wurden anschließend in einen Plasmidvektor kloniert. Eine Sequenzanalyse dieser Plasmidstandards bestätigte die künstlich geschaffene Punktmutation.

3.4.1 DHPLC-Analyse bei *S. tritici*

Die Etablierung des DHPLC Markers zur Detektion der G143A Mutation im Cytochrom *b* Gen von *Septoria tritici* erfolgte anhand der Plasmidstandards mit wildtyp und künstlich geschaffenem mutanten Allel. Bei der Isolation von Gesamt DNA aus infizierten Weizenblättern mit dem NucleoSpin Plant Kit (Machery Nagel) konnte Template DNA in ausreichender Qualität für nachfolgende PCR Analysen gewonnen werden. Mit den bereits in der Mutagenese verwendeten Primern St-mut-sf + St-mut-br wurde zunächst ein 302 bp großes Fragment aus dem Cytochrom *b* Gen amplifiziert. Die optimale Auftrennung der Homo- und Heteroduplexmoleküle erfolgte mit einem linearen Standardgradienten und einer Säulenofentemperatur von 57°C. Unter diesen Analysenbedingungen konnten der Homo- und beide Heteroduplexpeaks eindeutig detektiert werden (**Abbildung 20**).

Eine Validierung des DHPLC Markers erfolgte zunächst mit 33 phänotypisch charakterisierten QoI sensitiven Feldisolaten, da resistente Isolate zu diesem Zeitpunkt nicht zur Verfügung standen. Nach einem Resistenzmonitoring der EpiLogic GmbH (Freising, Weihenstephan) im Herbst 2002 wurden vier Feldisolate ausgewählt, die in den '*In-vitro*' Biotests resistent auf QoI Fungizide reagierten. Bei der DHPLC Analyse zeigten alle vier Isolate identische Homo- und Heteroduplexpeaks wie die künstlich geschaffenen mutanten Plasmidstandards. Eine Sequenzanalyse der entsprechenden Fragmente aus dem Cytochrom *b* Gen dieser auffälligen Isolate bestätigte in allen vier Fällen die G143A Mutation als Ursache für die QoI Resistenz. Damit wurde die G143A Mutation erstmals im Cytochrom *b* Gen von *Septoria tritici* Feldisolaten nachgewiesen.

DHPLC Analysen von Verdünnungsreihen aus Plasmiden mit mutantem Allel in einem zunehmenden Hintergrund von Plasmiden mit dem wildtyp Allel, genauso wie Verdünnungsreihen resistenter Allele in einem sensitiven Hintergrund auf Basis von PCR Produkten ergaben eine semiquantitative Detektionsleistung von 20% resistenter Allele in Feldmischproben von *Septoria tritici*. Trotz ausgesprochen diskreter Elutionspeaks konnte auch bei diesem Pathogen keine Korrelation zwischen der vor-

handenen Frequenz resistenter Allele in der DNA Lösung und den Peakhöhen bzw. -flächen durchgeführt werden.

3.5 Molekulare Markersysteme für Qol-Resistenz bei *Plasmopara viticola*

3.5.1 DHPLC-Analyse bei *P. viticola*

Mit Hilfe der in der EMBL Datenbank publizierte Cytochrom *b* Nukleotidsequenz von *Phytophthora infestans* (Akzessionsnummer EMBL: MIP11U170) wurden die PCR Primer PI-Cytb-f + PI-Cytb-r konstruiert, mit denen auch bei *Plasmopara viticola* ein 480 bp großes Fragment aus dem Cytochrom *b* Gen amplifiziert werden konnte. Nach einer Sequenzanalyse dieses Amplikons wurden die *Plasmopara viticola* spezifischen PCR Primer PV-N-f + PV-N-r abgeleitet, mit denen ein 264 bp großes Fragment für die DHPLC Analyse amplifiziert wurde.

Mit genomischer DNA, aus getrockneten infizierten Weinblättern, wurden zunächst nur sehr schlechte PCR Ergebnisse erzielt. Um die Matrixeffekte von PCR inhibierenden Substanzen in der DNA Lösung zu reduzieren, wurde das Protokoll des DNA Extraktionsverfahrens vom NucleoSpin Plant Kit (Machery Nagel) wie zuvor bei *Venturia inaequalis* modifiziert. Die Probenzerkleinerung wurde intensiviert, die Inkubation mit dem Isolationspuffer auf 14 Stunden verlängert und die Spülung der an die Säulchenmembran gebundenen genomischen DNA mit dem Waschpuffer CW dreimal wiederholt. Durch diese Maßnahmen wurde auch mit Gesamt DNA aus infizierten Weinblättern eine sehr effiziente Amplifikation erzielt.

Bei der DHPLC Analyse der mit den Primern PV-N-f + PV-N-r amplifizierten Fragmente von *Plasmopara viticola* wurde zunächst bei keiner Analysentemperatur eine Differenzierung von Homo- und Heteroduplexpeaks erreicht. Durch Modifikationen am Analysengradienten gelang schließlich bei einer Säulenofentemperatur von 58 °C eine Auftrennung der Homo- und Heteroduplexpeaks (**Abbildung 21**). Bei diesem Elutionsprofil befinden sich die analytischen Peaks sehr nahe am Injektionspeak, wodurch eine Auswertung der Chromatogramme erschwert wird. Weitere Modifikationen der Chromatographieparameter bewirkten bei dieser Applikation keine Verbesserung des Elutionsprofils. Eine qualitative Detektion Qol resistenter Allele konnte jedoch in allen Fällen zuverlässig durchgeführt werden. Die Evaluierung dieses DHPLC Markers erfolgte mit 17 Qol sensitiven und 5 Qol resistenten phänotypisch

charakterisierten Feldisolaten von *Plasmopara viticola*. Die Ergebnisse dieser molekularen Tests bestätigten die Boniturergebnisse aus den 'In vivo' Biotests.

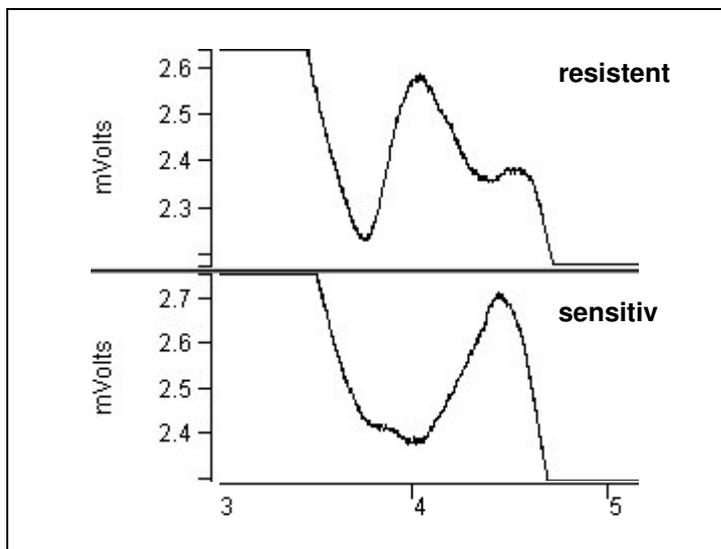


Abbildung 21: Differenzierung QoI resistenter und sensibler *Plasmopara viticola* Isolate mit der DHPLC Analyse

Aufgrund der ungünstigen Positionierung der analytischen Peaks und einem besonders hohen und schwankenden Grundrauschen der Messsignale wurde bei *Plasmopara viticola* auf eine Evaluierung der semiquantitativen Detektionsleistung QoI resistenter Allele verzichtet.

3.5.2 Quantitative allel-spezifische PCR bei *P. viticola*

Zur Detektion sehr geringer Frequenzen QoI resistenter Allele in Feldmischproben von *Plasmopara viticola* wurde eine quantitative allel-spezifische PCR Analyse etabliert. Neben dem allel-spezifischen ARMS System wurde ein PCR Referenzsystem zur Erfassung der Gesamtmenge aller Cytochrom *b* Kopien in der DNA Lösung eingerichtet. Die Evaluierung der Amplifikationskinetik des ARMS und des Referenz PCR Systems erfolgte mit Verdünnungsreihen genomischer DNA vom resistenten Standardisolat 463. Bei diesen Reihen wurde die DNA über sechs Stufen hinweg jeweils 1:10 mit Wasser verdünnt. Die niedrigste Verdünnungsstufe enthielt einen relativen Anteil von 0,001% bezogen auf die Ausgangsmenge. In PCR Experimenten mit variierenden Primerkonzentrationen und Annealingtemperaturen konnten optimale Bedingungen für die Differenzierung der Verdünnungsstufen ermittelt werden. Alle nachfolgenden quantitativen PCR Analysen wurden infolgedessen mit einer Konzent-

ration von 900 nM je Primer und einer PCR Annealingtemperatur von 61 °C durchgeführt. Mit diesen Analysenparametern wurde bei beiden PCR Systemen über sechs Verdünnungsstufen hinweg diskrete Ct-Werte gemessen (**Abbildung 22**).

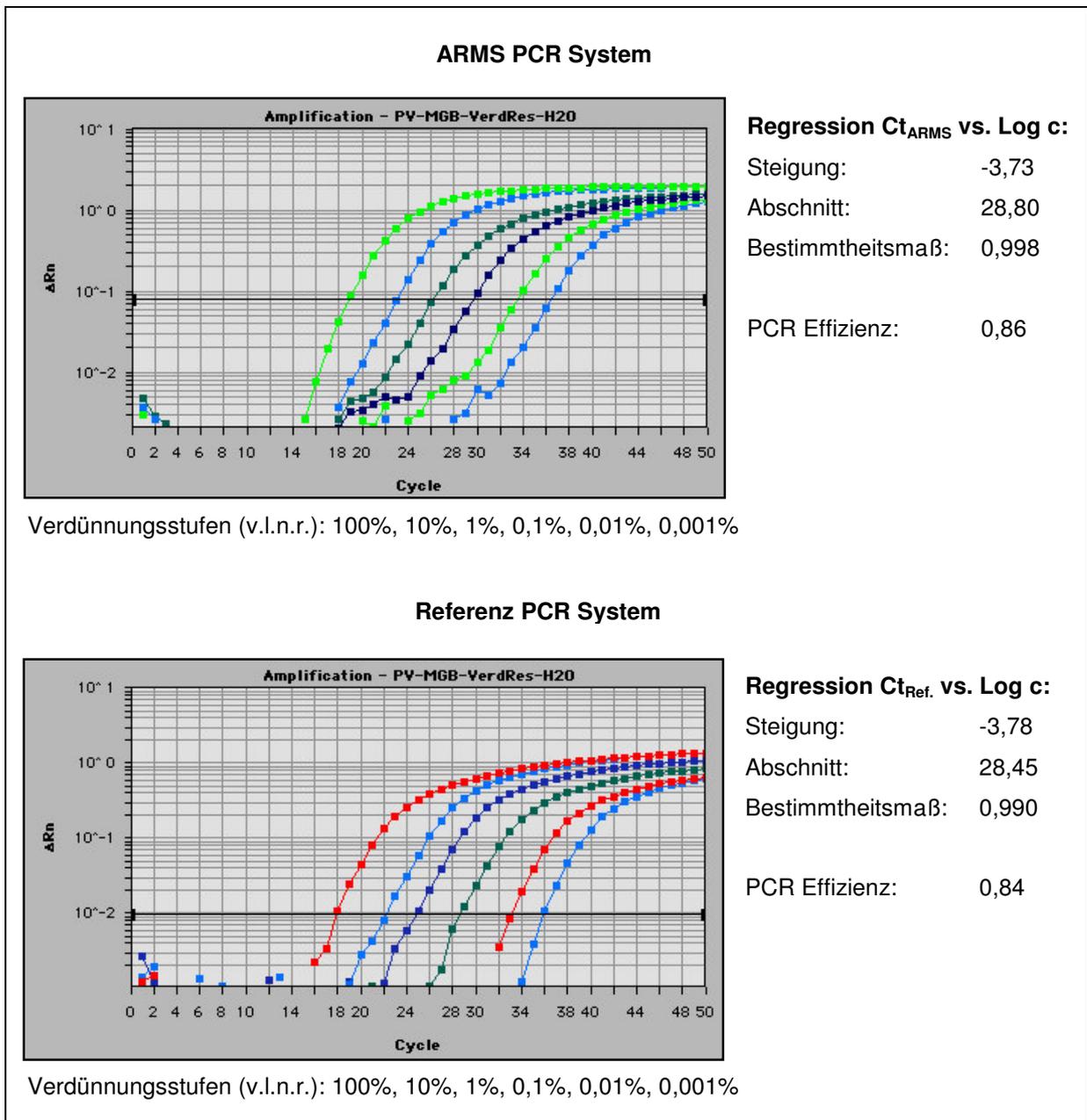


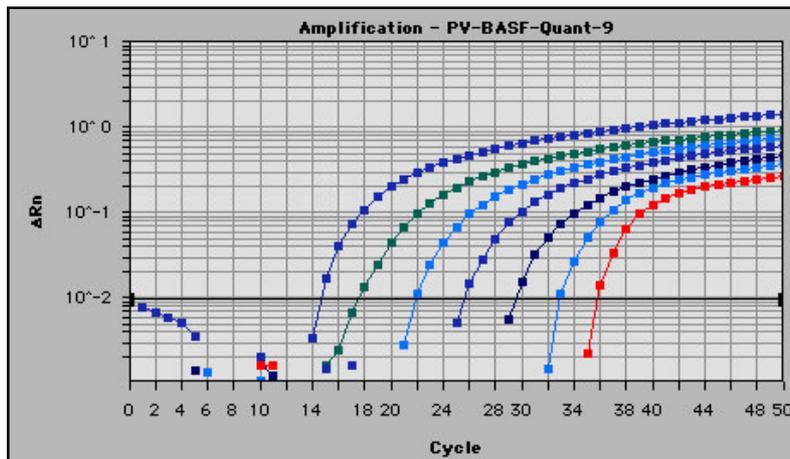
Abbildung 22: Amplifikationsplots des ARMS und Referenz PCR Systems bei einer Verdünnungsreihe resistenter genomischer DNA mit Wasser und die Parameter der linearen Regression der Ct-Werte gegen den Log der relativen Konzentration resistenter Allele

Bei drei Wiederholungen dieses PCR Experiments mit den optimierten Reaktionsbedingungen wurden sehr einheitliche PCR Effizienzen von durchschnittlich 0,86 beim ARMS System und 0,84 beim Referenzsystem beobachtet. Die Regression der Ct-Werte gegen den Logarithmus der eingesetzten Kopienzahlen erreichte in beiden Fällen eine sehr hohe Präzision mit Bestimmtheitsmaßen von 0,998 beim

ARMS System, bzw. von 0,990 beim Referenz System. Die Schwellenwerte, bei deren Überschreitung des Fluoreszenzsignals eine Erfassung der Ct-Werte stattfindet, wurden nach dem Prinzip zur Minimierung der relativen Effizienz beider PCR Systeme zueinander definiert. Dabei ergaben sich Schwellenwerte von 0,01 für das ARMS System und 0,08 für das Referenzsystem. Mit diesen Parametern errechnete sich eine relative Effizienz der beiden PCR Systeme zueinander von 0,039. Die Grenzmarke von 0,1 wird nicht überschritten und dadurch Linearität beider Systeme über die Verdünnungsstufen hinweg gewährleistet. Diese Werte bestätigen nach den 'Richtlinien zur Optimierung einer TaqMan[®] PCR' (Applied Biosystems) die Tauglichkeit des Referenzsignals zur Nivellierung der Quantifizierungsergebnisse.

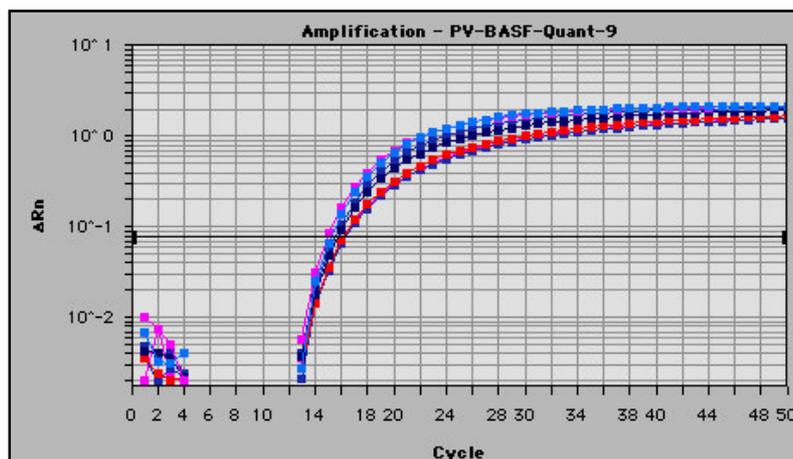
Zur Beurteilung der allelischen SNP Diskriminierungsleistung wurden Verdünnungsreihen genomischer DNA des resistenten Isolates 463 mit genomischer DNA des sensitiven Isolates 59 unter den zuvor ermittelten optimierten PCR Bedingungen analysiert (**Abbildung 23**). Bei diesen Reihen nahmen die relativen Anteile der resistenten Allele pro Verdünnungsstufe jeweils um den Faktor 10 ab, wogegen die Gesamtmenge der Cytochrom *b* Kopien über alle Stufen hinweg konstant blieb. Aus der Differenz der Ct-Werte des ARMS und des Referenz PCR Systems wurden die Δ Ct-Werte berechnet. Bis zur niedrigsten Verdünnungsstufe mit einem relativen Anteil von 0,001% resistenter Allele wurde keine Überschneidung der Δ Ct-Werte mit den Δ Ct-Werten der Leerprobe (0%) beobachtet. Bei Versuchen mit einer zusätzlichen Verdünnungsstufe mit einem relativen Anteil von 0,0001% resistenter Allele wurden Δ Ct-Werte gemessen, die eine deutliche Überschneidung mit den Signalen des Leerwertes aufwiesen. Diese Signale stammen aus der fehlerhaften Amplifikation sensitiver Allele mit dem allel-spezifischen ARMS Primer. Bedingt durch die identische Cytochrom *b* Kopienzahl aller Verdünnungsstufen lieferte das Referenz PCR System bei den Kalibrationsstandards einheitliche Ct-Werte (**Abbildung 23**).

ARMS PCR System



Verdünnungsstufen (v.l.n.r.): 100%, 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001%, 0%

Referenz PCR System



Verdünnungsstufen: 100%, 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001%, 0%

Regression ($Ct_{ARMS} - Ct_{Referenz}$) vs. Log c:

Steigung:	-3,69
Abschnitt:	5,68
Bestimmtheitsmaß:	0,995
Gesamt Effizienz:	0,87

Abbildung 23: Amplifikationsplots des ARMS und Referenz PCR Systems bei einer Verdünnungsreihe resistenter in sensibler genomischer DNA und die Parameter der linearen Regression der ΔCt -Werte gegen den Log der relativen Konzentration resistenter Allele

Eine absolute Quantifizierung von Cytochrom *b* Kopien und resistenten Allelen mit genomischen DNA Verdünnungsreihen kann nicht durchgeführt werden, da eine Messung der Kopienzahlen durch den genomischen Hintergrund von Pflanze und Pilz bereits in den Kalibrationsstandards nicht möglich ist. Aus diesem Grund war auch eine absolute Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen mit diesen Kalibrationslösungen nicht möglich.

Infolgedessen wurden sowohl für das resistente, als auch für das sensitive Allel klonierte Plasmidstandards mit geeigneten Ausschnitten aus dem Cytochrom *b* Gen hergestellt. Zunächst wurde mit den PCR Primern PV-D2-f und PV-D2-r ein 359 bp großes Fragment aus den beiden Standardisolaten 463 und 59 amplifiziert und in den Vektor kloniert. Die isolierten Plasmide wurden mit dem PicoGreen DNA Quantitation Kit (Molecular Probes) quantifiziert. Die Konzentrationen der Plasmid DNA Lösungen mit resistentem und dem sensitivem Allel betragen 137 ng/μl bzw. 154 ng/μl. Daraus resultieren ca. 3×10^{12} Cytochrom *b* Kopien je Allel insgesamt. Um unterschiedliche Erscheinungsformen von zirkulären Plasmiden ausschließen zu können, wurden die Plasmide mit dem Restriktionsenzym *ScaI* linearisiert. Nach der Aufreinigung und einer weiteren Quantifizierung mit dem PicoGreen DNA Quantitation Kit wurden die linearisierten Plasmidstandards auf einheitliche Konzentrationen von 10^7 Kopien/μl verdünnt. Bei der Analyse der Plasmidstandards mit dieser Konzentration wurden mit dem Referenz PCR System identische Ct-Werte von 16,5-17,0 wie bei den genomischen Kalibrationsstandards gemessen.

Eine korrekte Quantifizierung resistenter Allele in Feldmischproben mit klonierten Kalibrationsstandards kann nur dann erfolgreich durchgeführt werden, wenn bei der Amplifikation von genomischen und Plasmid DNA Lösungen eine identische PCR Kinetik anzutreffen ist. Um einen Einfluss PCR inhibierender Matrixeffekte in genomischen DNA Lösungen von *Plasmopara viticola* beurteilen zu können wurden drei verschiedene Verdünnungsreihen mit jeweils relativen Anteilen resistenter Allele von 100% - 0,001% und konstanten Cytochrom *b* Gesamtkopienzahlen untersucht:

- Verdünnungsreihe genDNA (resistentes Allel) in genDNA (sensitives Allel)
- Verdünnungsreihe Plasmid (resistentes Allel) in genDNA (sensitives Allel)
- Verdünnungsreihe Plasmid (resistentes Allel) in Plasmid (sensitives Allel)

Bei den Vergleichsexperimenten mit diesen drei Verdünnungsreihen wurden sowohl vom ARMS- als auch vom Referenz PCR System jeweils fünf Wiederholungen je Kalibrationsstufe durchgeführt. Bei allen drei Verdünnungsreihen wurden die Ct-Werte nach den eingangs ermittelten optimierten Schwellenwerten erfasst und die Regressionsdaten der Δ Ct-Werten gegen den Logarithmus der relativen Anteile resistenter Allele je Verdünnungsstufe, sowie die durchschnittlichen Gesamt PCR Effizienzen errechnet. Ferner wurden bei jeweils paarweisen Vergleichen der drei Reihen die relativen Effizienzen der einzelnen Amplifikationen zueinander ermittelt.

Tabelle 15: Regressionsparameter und relative Effizienzen beim Vergleich von genomischen und klonierten Verdünnungsreihen

Verdünnungsreihe – Variante	Steigung	Abschnitt	R²	Effizienz
gg	-3,490	22,96	0,9933	0,93
pg	-3,402	22,02	0,9954	0,97
pp	-3,462	22,61	0,9977	0,94
Paarweiser Vergleich	Relative Effizienz			
gg-pg	0,0354			
pg-pp	0,0527			
gg-pp	0,0173			

gg: Verdünnungsreihe genDNA (resistentes Allel) in genDNA (sensitives Allel)
 pg: Verdünnungsreihe Plasmid (resistentes Allel) in genDNA (sensitives Allel)
 pp: Verdünnungsreihe Plasmid (resistentes Allel) in Plasmid (sensitives Allel)

Beim Vergleich der Regressionsparameter dieser drei Verdünnungsreihen wurden sehr einheitliche Werte errechnet, die weniger voneinander differierten als bei wiederholter Amplifikation einer Verdünnungsreihe. Die relativen Effizienzen der Systeme zueinander resultierten allesamt in Werten unter der maximal zulässigen Schwelle von 0,1. Damit wurde gezeigt, dass mit den hier verwendeten genomischen DNA Lösungen aus infizierten Blättern von *Plasmopara viticola* keine Matrixeffekte in den PCR Experimenten auftreten und eine identische Amplifikationskinetik wie bei klonierten Standards anzutreffen ist. Eine Quantifizierung resistenter Allele in Feldmischproben von *Plasmopara viticola* mit klonierten Kalibrationsstandards ist deshalb zulässig.

Mit der Kalibrationsgleichung der Plasmid - Plasmid Verdünnungsreihe wurde eine Rückquantifizierung resistenter Allele über die ermittelten Δ Ct-Werte jeder Verdünnungsstufe durchgeführt. Kolmogorov-Smirnov Tests auf Normalverteilung wurden

mit den normalisierten Ct-Werten und den normalisierten errechneten Quantifizierungsergebnissen durchgeführt. Bei einem Signifikanzniveau von 95% wurde Normalverteilung für die ΔCt -Werte bestätigt und für die Quantifizierungsergebnisse abgelehnt. Die Berechnung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze, sowie der Vertrauensbereiche der Kalibrationsstufen erfolgte deswegen mit den ΔCt -Werten. Anschließend wurden diese Zwischenergebnisse in die Kalibrationsgleichung eingesetzt und auf Kopienzahlen umgerechnet. Aufgrund der identischen Amplifikationskinetik und den übereinstimmenden Regressionsparametern bei klonierten und genomischen Kalibrationsstandards (**Tabelle 15**) wird bei gleichen Ct-Werten des PCR Referenzsignals von einer identischen Ausgangszahl an Cytochrom *b* Kopien bei den qPCR Analysen ausgegangen.

Tabelle 16: Übersicht über die relativen Vertrauensbereiche sowie die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze der quantitativen allel-spezifischen PCR Analyse zur Detektion resistenter Allele in Feldmischproben von *Plasmopara viticola*

Vorgegebene Kopienzahl	n	Rückquantifizierung	Rel. Vertrauensbereich ($\alpha=0,05$)	
			min.	max.
30.000.000	5	27.074.329	18%	22%
3.000.000	5	3.766.450	21%	27%
300.000	5	294.769	14%	16%
30.000	5	27.151	4%	4%
3.000	5	2.596	17%	20%
300	5	356	9%	10%
0	5	70		32%

	absolut	relativ
Nachweisgrenze:	92	0,0003%
Erfassungsgrenze:	122	0,0004%
Bestimmungsgrenze:	162	0,0005%

Von jeder Kalibrationsstufe wurden Vertrauensbereiche auf einem Signifikanzniveau von 95% berechnet. In der DIN 53804-1 werden für eine erfolgreiche Quantifizierung relative Varianzen von maximal 33% verlangt. Diese Schwelle wird bei der hier untersuchten Verdünnungsreihe über den kompletten Kalibrationsbereich nicht überschritten. Die Berechnung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze über die Leerwertmethode aus der Messung an den Leerproben nach DIN 32645 resultiert in absoluten Kopienzahlen. Diese Ergebnisse sind in **Tabelle 16** zusammengefasst.

Aus den angegebenen absoluten Werten ergibt sich bei 30.000.000 in der qPCR Analyse eingesetzten Cytochrom *b* Kopien eine relative Nachweisgrenze von 0,0003%, eine relative Erfassungsgrenze von 0,0004% und eine relative Bestimmungsgrenze von 0,0005% resistenter Allele.

4 Diskussion

4.1 Molekulare Grundlagen von Fungizidresistenzen

Im großen Sortiment kommerzieller fungizider Wirkstoffe konnten bisher nur für einige wenige Wirkstoffgruppen Resistenzen in Pathogenen molekulargenetisch eindeutig charakterisiert werden. Bei vielen Fungizidklassen ist aufgrund fehlender biochemischer Aufklärung der Resistenzmechanismen eine molekulargenetische Resistenzanalyse nicht möglich. Bei anderen Wirkstoffgruppen erschweren komplex polygen vererbte Fungizidresistenzen die Entwicklung überschaubarer und aussagekräftiger Markersysteme. Für Wirkstoffe aus den Gruppen der Qo Inhibitoren (QoIs), der Benzimidazolfungizide (MBCs) und der Demethylierungshemmstoffe (DMIs) konnten die genetischen Ursachen für die Fungizidresistenz bei verschiedenen Pathogenen aufgeklärt werden. In den meisten Fällen werden dabei Punktmutationen (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) in der Gensequenz des Fungizid-Zielproteins für den Resistenzmechanismus verantwortlich gemacht. Interessanterweise sind bei den wenigen Fungizidklassen, bei denen die molekularen Grundlagen von Resistenzen bisher erfolgreich aufgeklärt werden konnten, wirtschaftlich sehr bedeutsame Pflanzenschutzprodukte vertreten (**Tabelle 17**).

Verminderte Sensitivität gegenüber QoI Fungizide ist erstmals 1998 bei *B. graminis*, f.sp. *tritici* beobachtet worden (FELSENSTEIN 1999). Seitdem nimmt das Spektrum an Pathogenen, die gegen diesen Wirkstoff Resistenz entwickeln konnten jährlich zu. Verschiedene Mutationen, die einem Organismus Resistenz gegenüber QoI Fungizide verleihen sind ausführlich beschrieben worden (BRASSEUR et al. 1996). Bei fast allen bisher identifizierten resistenten pilzlichen Pathogenisolaten wurde die G143A Punktmutation im Cytochrom *b* Gen für ein hohes Maß an Resistenz gegenüber QoIs verantwortlich gemacht (GEHMANN et al. 2003). Bei einigen Pathogenen ist im Cytochrom *b* Gen daneben die Punktmutation F129L bekannt, die allerdings eine wesentlich schwächere Form von Resistenz vermittelt (FARMAN 2001). Bei *Venturia inaequalis* wurde darüber hinaus eine metabolische Form von QoI Resistenz beschrieben, deren biologischer und genetischer Hintergrund bisher nicht näher charakterisiert werden konnte (STEINFELD et al. 2002). Die biochemisch sehr gut dokumentierte Wirkungsweise und die überschaubaren genetischen Ursachen (Mutationen) der bisher bekannt gewordenen Resistenzfaktoren sowie die entscheidende wirtschaftliche Bedeutung der QoI Fungizide tragen dazu bei, dass die Etablierung

von molekularen Markern zur Detektion resistenter Isolate in Feldpopulationen gerade für diese Fungizidklasse sehr sinnvoll erscheint. Aufgrund der vollständigen Kreuzresistenz aller QoI Fungizide können die Ergebnisse der molekularen Untersuchungen auf alle verfügbaren kommerziellen QoI Produkte übertragen werden.

Im Gegensatz zu den QoI Fungiziden verhindern Benzimidazolfungizide den Zusammenbau des Tubulins während der Mitose indem sie an die β -Tubulin Proteine binden. Resistenzen gegen diesen Wirkstoff sind bei vielen Pathogenen weltweit sehr verbreitet (DAVIDSE et al. 1995). Verantwortlich dafür sind meist Punktmutationen in der Nukleotidsequenz des β -Tubulins (KOENRAADT et al. 1992; BUTTERS & HOLLOWAY 1998), die ein unterschiedliches Maß an Resistenz verleihen können (DAVIDSE et al. 1995). Viele dieser Mutationen beeinflussen die Fitness der betroffenen Organismen nicht. Besonders weit verbreitet sind Mutationen, die einen Aminosäureaustausch von Glutamat an der Position 198 durch Glycin (E198G) bei *Rhynchosporium secalis* und *Venturia inaequalis*; durch Lysin (E198K) bei *Botrytis cinerea*, *Monilia fructicola* und *Venturia inaequalis* oder durch Alanin (E198A) bei *Botrytis cinerea* und *Venturia inaequalis* verursachen. Diese Mutationen sind verantwortlich für ein mittleres, hohes, bzw. sehr hohes Level an Resistenz gegenüber Benzimidazolfungizide. Daneben ist ein Aminosäureaustausch des Phenylalanins durch Tyrosin (F200Y) bekannt, der *Botrytis cinerea* und *Venturia inaequalis* ein mittleres Maß an Resistenz verleiht (KOENRAADT et al. 1992). Im Gegensatz zu den QoIs können Resistenzen gegenüber MBC Fungizide also durch sehr viele mögliche Mutationen im Zielprotein verursacht werden. Für eine wirkungsvolle Exprimierung der Resistenz müssen mehrere dieser Mutationen gleichzeitig in einem Isolat anzutreffen sein.

Sämtliche Benzimidazole (Benomyl, Carbendazim, Fuberidazole und Thiabendazole) und Thiophanatfungizide sind kreuzresistent. Innerhalb der Gruppe der Benzimidazole können sich die beschriebenen Mutationen dennoch unterschiedlich stark auf die Reaktion gegenüber einzelne Wirkstoffe auswirken. Unterschiedlich starke und sogar negative Kreuzresistenzmuster bei unterschiedlichen Pathogenen sind oft zu beobachten (LEROUX et al. 2000). Der kürzlich entdeckte Wirkstoff Zoxamide wird speziell beim Einsatz gegen Oomyceten nicht zur MBC Kreuzresistenzgruppe gerechnet, obwohl dieser ebenfalls den Zusammenbau des β -Tubulins inhibiert. Bei der Bekämpfung von Pilzen anderer Klassen mit diesem Wirkstoff ist der Zusammenhang mit der Benzimidazol-Fungizidgruppe immer noch unklar (YOUNG et al. 2001).

Mehr als 20 verschiedene fungizide Wirkstoffe (z.B. Triadimenol, Propiconazol, Difenconazol, Epoxikonazol) gehören zu der Gruppe der Demethylierungshemmstoffe (DMIs). All diese Substanzen hemmen die Cytochrom P450 abhängige 14 α -Demethylase bei der Biosynthese von pilzlichen Sterolen wie dem Ergosterol (KUCK et al. 1995). Die DMIs gehören genauso wie die Amine (z.B. Morpholine, Piperidine, Spiroketalamine) und die Hydroxyanilide (Fenhexamid) zur großen Gruppe der Ergosterol-Biosynthesehemmstoffe (EBIs). Zwischen diesen drei Gruppen von EBIs besteht jedoch keinerlei Kreuzresistenz (KUCK 2001). DMI resistente Isolate sind bei einer Reihe von pilzlichen Pathogenen im agronomischen und medizinischen Bereich bekannt (VANDEN BOSSCHE & IBROAM 1997). Die Resistenzen entwickeln sich in pilzlichen Population meist über mehrere Generationen hinweg schrittweise in einem Shifting Prozess, weshalb eine polygene Vererbung angenommen wird (KUCK et al. 1995). Eine große Bedeutung haben Punktmutationen im Zielgen *cyp51*. Eine dieser Mutationen ist für den Aminosäureaustausch von Tyrosin durch Phenylalanin an der Position 136 (Y136F) verantwortlich (DELYE et al. 1997). Die Y136F Mutation verleiht auch *Uncinula necator* und *B. graminis* ein hohes Maß an Resistenz gegenüber DMI Fungizide. Weitere Punktmutationen im *cyp51* Gen sind bei einigen *Candida* Arten bekannt (DELYE et al. 1997). Neben diesen Punktmutationen wurde bei manchen pilzlichen Pathogenen eine Überexpression des *cyp51* Gens beobachtet, was durch eine Duplikation eines Enhancer Elements in der Promotorregion dieses Gens verursacht wird. Dieser Mechanismus wurde auch bei *Venturia inaequalis* und *Penicillium digitatum* beobachtet (SCHNABEL & JONES 2001; WHITE 1997). Ein weiterer Resistenzmechanismus wird durch einen erhöhten Efflux von Inhibitor Molekülen durch eine Überexpression von spezifischen ABC Transporterproteinen verursacht (HAMAMOTO et al. 2001B; ZWIERS & DE WAARD 2000). Dieses Prinzip ist vor allem bei *Candida* Arten bekannt (WHITE 1997), während bei Phytopathogenen dadurch nur ein geringer Anteil zur DMI Resistenz beigetragen wird.

Es existiert ferner ein großes Spektrum an Fungiziden, von denen zwar die Wirkungsmechanismen im pilzlichen Stoffwechsel identifiziert, die genetischen Hintergründe für Resistenzen bisher jedoch in keinem Pathogen aufgeklärt werden konnten. Hierzu zählen Wirkstoffe aus den Kreuzresistenzgruppen der Dicarboxamide, der Carboxamide, der Phenylpyrrole, der Anilinopyrimidine und der Phenylamide. Aufgrund der komplizierten heterogenen genetischen Konstellation resistenter Geno-

typen erscheint eine Entwicklung molekularer DNA Marker für ein Resistenzmonitoring hier nicht sehr erfolgversprechend.

Bei einigen Fungizidklassen, bei denen ebenfalls resistente pilzliche Isolate bekannt sind, ist neben den genetischen Ursachen der Resistenz auch der genaue Wirkungsort des Fungizides im pilzlichen Stoffwechsel noch nicht eindeutig aufgeklärt worden. Hierzu zählen Produkte aus den Kreuzresistenzgruppen der Cinnaminsäuren, der Kasugamycine, der Polyoxine und der Phosphoro-thiolate. Ohne weitere Aufklärung dieser molekularen Grundlagen ist der Einsatz von molekularen Diagnosesystemen zur Detektion von resistenten Pathogenisolaten bei diesen Wirkstoffgruppen nicht möglich.

4.2 Molekulare Marker für Fungizidresistenzen

Im großen Sortiment kommerzieller fungizider Wirkstoffe befinden sich im Moment nur drei Kreuzresistenzgruppen, für die man bisher molekulare Marker zur Detektion von Resistenzmechanismen in pilzlichen Phytopathogenen entwickeln konnte. Dazu gehören neben den Qo Inhibitoren die Benzimidazolfungizide (MBCs) und einige Vertreter der Demethylierungshemmstoffe (DMIs). Im einfachsten Fall beruht eine verminderte Fungizidsensitivität auf Insertionen/Deletionen im Gen des Fungizid Zielproteins. Diese Situation kennt man bei *Venturia inaequalis* und *Penicillium digitatum* in Form einer Überexpression des *cyp51* Gens bedingt durch eine Duplikation eines Enhancer Elements in der Promotorregion dieses Gens (WHITE 1997; SCHNABEL & JONES 2001). HAMAMOTO et al. (2001a) konnten durch Amplifikation der Promotorregion des *cyp51* Gens und anschließender Detektion der Fragmentlängen Polymorphismen auf ethidiumbromidgefärbten Agarosegelen resistente Formen von *Penicillium digitatum* zuverlässig identifizieren. In den allermeisten Fällen jedoch werden Fungizidresistenzen in pilzlichen Phytopathogenen durch Punktmutationen (SNPs) in den entsprechenden Genen der Fungizid Zielproteine verursacht. Eine Detektion von Resistenzmechanismen mit molekularen Markern erfolgt deshalb in erster Linie mit SNP Detektionssystemen (**Tabelle 17**).

Tabelle 17: Fungizidklassen, Resistenzmechanismen und molekulare Detektionsmethoden (abgewandelt nach Sierotzki & Gisi 2002)

Fungizidklasse ^{a)}	Beispiele von Wirkstoffen	Target-Enzym	Resistente Pathogene ^{b)} (Feldisolate)	Resistenzmechanismus	Molekulare Detektionsmethoden ^{c)}
Qols	Azoxystrobin, Kresoxim-Methyl	Cytochrom <i>bc₁</i>	8,10,11,12,17,18,20,24,25	Mutationen im Cytochrom <i>b</i> Gen (G143A, F129L)	ARMS-Scorpion, AS-PCR, CAPS, DHPLC, qPCR
MBCs	Benomyl	β -Tubulin	4,9,11,19,23,24	Mutationen im β -Tubulin Gen	PCR-ASO, CAPS, SSCP, qPCR
Benzamide	Zoxamide	β -Tubulin		-	
N-Phenyl-Carbamate	Diethofencarb	β -Tubulin	19,23	Mutation im β -Tubulin	
EBIs	DMIs: Tridimenol, Propiconazol, Epoxiconazol Amine: Fenpropidin	<i>C14</i> -Demethylase Δ 14-Reduktase und Δ 7/ Δ 8-Isomerase	8,10,24	Mutation im <i>cyp51</i> Gen (Y136F), im <i>cyp51</i> Promotor und im ABC Transporter	AS-PCR, qPCR
Dicarboximide	Vinclozolin	NADPH-Cytochrom <i>c</i> Reductase	2,3,4,5,7,14,18	Mutationen in der Kinase <i>os1</i> (I365S und weitere)	
Carboxamide	Carboxin	Succinatdehydrogenase (<i>sdh</i>)	21,22	Mutation in <i>sdh</i> (H2575L)	
Phenylpyrrole	Fludioxonil	Protein-Kinase (in der Glycerol Synthese)	4	Mutationen in der Protein-Kinase (<i>os2</i>) und im ABC Transporter Gen	
Anilino-Pyrimidine	Cyprodinil	Cystathione β -Lyase Cystathione γ -Synthase L-Methionin Synthese	4,24	Bypass Reaktionen, Mutationen im <i>cgs</i> Gen (S24P, I64V), im ABC Transporter	

Tabelle 17: Fungizidklassen, Resistenzmechanismen und molekulare Detektionsmethoden (abgewandelt nach SIEROTZKI & GISI 2002)

Fungizidklasse ^{a)}	Beispiele von Wirkstoffen	Target-Enzym	Resistente Pathogene ^{b)} (Feldisolat)	Resistenzmechanismus	Molekulare Detektionsmethoden ^{c)}
Phenylamide	Metalaxyl	RNA Polymerase I (r-RNA)	6,13,15,17	Mutationen in der RNA Polymerase	-
Cinnaminsäuren	Dimethomorph	(Zellwandsynthese)	14	-	-
Kasugamycin	Kasugamycin	(Proteinbiosynthese)	16	Mutationen in den Ribosomen	-
Polyoxine	Polyoxin D	(Chitinbiosynthese)	1	Verringerte Dipeptid-Permease	-
Phosphoro-Thiolate	Pyrazophos	(Phospholipidbiosynthese)	16	Mutationen im Pyrazophos Metabolismus	-

a) EBIs: Ergosterolbiosynthese Hemmstoffe, QoIs: Hemmstoffe der Qo Stelle des mitochondrialen Komplex III, MBCs: Methyl-Benzimidazol-Carbamate

b) 1: *Alternaria kikuchina*, 2: *Alternaria alternata*, 3: *Alternaria liniola*, 4: *Botrytis cinerea*, 5: *Botrytis fabae*, 6: *Bremia lactucae*, 7: *Didymella lycopersici*, 8: *Blumeria graminis*, 9: *Helminthosporium solani*, 10: *Mycosphaerella fijiensis*, 11: *Mycosphaerella graminicola*, 12: *Magnaporthe grisea*, 13: *Pseudoperonospora cubensis*, 14: *Phoma exigua*, 15: *Phytophthora infestans*, 16: *Pyricularia oryzae*, 17: *Peronospora parasitica*, 18: *Plasmopara viticola*, 19: *Rhynchosporium secalis*, 20: *Sphaerotheca fuliginea*, 21: *Ustilago maydis*, 22: *Ustilago nuda*, 23: *Venturia nashicola*, 24: *Venturia inaequalis*, 25: *Septoria tritici*

c) qPCR: quantitative allel-spezifische Amplifikation, ARMS: amplification refractory mutation system, AS-PCR: allele-specific PCR, CAPS: cleaved amplified polymorphic sequences, SSCP: single stranded conformation polymorphism, DHPLC: denaturing high performance liquid chromatography, PCR-ASO: PCR allel-specific oligonukleotides

Je nach verwendeter Strategie bei der Diskriminierung der SNP Allele werden molekulare Markersysteme zur Detektion von Fungizidresistenzen in verschiedene Gruppen eingeteilt.

Von LUCK & GILLINGS (1995) wurde ein CAPS Marker zur Detektion von Resistenz gegen das Fungizid Benomyl bei Stämmen von *Botrytis cinerea* entwickelt. Mit der selben Technik konnten einige Punktmutationen im β -Tubulin Gen von *Cladobotrytum dendroides* detektiert werden, die für Resistenz gegenüber MBC Fungizide verantwortlich sind (MCKAY et al. 1998). Ebenso wurde bei *Helminthosporium solani* ein PCR-Fragment aus dem β -Tubulin Gen allel-spezifisch hydrolysiert und dadurch MBC Resistenz belegt (COOKE & MCKAY 1999). CAPS Analysen zur Detektion von QoI Fungizidresistenz sind bekannt bei *B. graminis* f.sp. *tritici* bzw. *B. graminis* f.sp. *hordei*, *Mycosphaerella fijiensis* und *Venturia inaequalis* (SIEROTZKI et al. 2000b; WILLE et al. 2002; BÄUMLER et al. 2003a & 2003b). Bei all diesen Pathogenen erfolgte nach einer pathogenspezifischen Amplifikation der entsprechenden Cytochrom *b* Gensequenzen eine allel-spezifische Restriktion der PCR Amplikons mit der Restriktionsendonuklease *I*taI. Die CAPS Analysen wurden bisher ausschließlich zur qualitativen Detektion der G143A Punktmutationen beschrieben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die quantitative Detektionsleistung eines CAPS Markersystems für QoI resistente Allele in *B. graminis* f.sp. *tritici*, *B. graminis* f.sp. *hordei* und *Venturia inaequalis* evaluiert (BÄUMLER et al. 2003a). Mit Hilfe von Verdünnungsreihen aus PCR Amplikons resistenter und sensitiver Isolate wurde bei diesem Markersystem eine Detektionsgrenze für resistente Allele von 10-50% bei *B. graminis* bzw. von ca. 20% bei *Venturia inaequalis* geschätzt.

Bei allel-spezifischen PCR Analysen (AS-PCR) wird einer der PCR Primer so konstruiert, dass die Diskriminierung der SNP Allele von Wildtyp und Mutante durch die 3' terminale Base stattfindet. Mit dieser Technik konnten Mutationen im 14- α -Demethylase Gen von *Uncinula necator* (DELYE et al. 1997) und *B. graminis* f.sp. *hordei* (DELYE et al. 1998) detektiert werden, die für Resistenz gegenüber Sterolbiosynthesehemmstoffe verantwortlich sind. AS-PCR Analysen sind auch zur Detektion der G143A Mutation in *Mycosphaerella fijiensis* und *B. graminis* f.sp. *tritici* (WILLE et al. 2002; FRAAIJE et al. 2002; ROHEL et al. 2002; LUCAS 2001; BÄUMLER et al. 2003a & 2003b) sowie der F129L Mutation bei *Plasmopara viticola* (STEINFELD et al. 2002) beschrieben worden. Bei der in dieser Arbeit beschriebenen AS-PCR Analyse zur

Detektion der G143A Mutation in *B. graminis* f.sp. *tritici* wurde die allelische Diskriminierung durch einen 'Nested PCR' Ansatz optimiert (BÄUMLER et al. 2003a). Mit einem zusätzlichen PCR Primer, der eine konkurrierende Situation mit dem allelspezifischen Primer einnimmt, konnte die Präzision der Analysenmethode wesentlich erhöht werden.

Bei der Heteroduplexanalyse mit der SSCP Technik werden einzelsträngige PCR Fragmente aufgrund unterschiedlicher physikalischer Eigenschaften auf Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Mit diesem Verfahren konnten PCR Fragmente von *Venturia nashicola* Isolaten unterschieden werden, die sensitive und resistente Reaktion gegenüber Benzimidazolfungiziden aufwiesen (ANONYM 1996). Die Heteroduplexanalyse mit der SSCP Technik erlaubt nur ein geringes Maß an Automatisierbarkeit wodurch kostengünstige und schnelle Resistenzanalysen von großen Probenmengen nicht realisierbar sind. Darüber hinaus werden mit dieser Methode einige Mutationen nicht zuverlässig erfasst. GROSS et al. (1999) zeigten, dass mit der SSCP Technik bei 113 verschiedenen PCR Amplikons nur 94% der vorhandenen Mutationen tatsächlich detektiert werden konnten. Im Gegensatz dazu wurden bei der Heteroduplexanalyse mit der DHPLC Technik alle Mutationen zuverlässig detektiert.

Die DHPLC Technologie wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals zur Detektion von Fungizidresistenzen in pilzlichen Phytopathogenen eingesetzt (BÄUMLER et al. 2003a, 2003b). Mit diesem Markersystem erfolgte die Detektion der G143A Mutation bei *B. graminis* f.sp. *tritici*, *B. graminis* f.sp. *hordei*, *Venturia inaequalis*, *Septoria tritici* und *Plasmopara viticola*. Bei all diesen Pathogenen konnte mit der DHPLC Technik eine schnelle und kostengünstige qualitative QoI Resistenzanalyse an Einzelsporenisolaten durchgeführt werden. Außerdem war mit dieser Methode eine semiquantitative Detektion QoI resistenter Allele in Feldmischproben bis zu einem relativen Anteil von ca. 20% bei *B. graminis* f.sp. *tritici*, *B. graminis* f.sp. *hordei*, *Venturia inaequalis* und *Septoria tritici* möglich.

Bis zur Getreidesaison 2002 wurde weltweit noch kein QoI resistentes *Septoria tritici* Isolat identifiziert. Um im Falle einer Resistenzbildung durch eine G143A Mutation im Cytochrom *b* Gen von *Septoria tritici* unverzüglich mit einem Resistenzmonitoring beginnen zu können, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein entsprechender DHPLC Assay unter Verwendung von künstlich geschaffener Plasmidstandards etabliert. Das resistente Allel wurde dabei in Anlehnung an alle bisher identifizierten

G143A Mutationen mit einem Austausch von Guanosin durch Cytosin in der mittleren Position des Glycin Triplets der entsprechenden Aminosäure 143 in ein PCR Amplikon eingeführt. Vier *Septoria tritici* Isolate, die in den 'in-vivo' Biotests der EpiLogic GmbH (Freising, Weihenstephan) im Herbst 2002 auffällig reagierten, zeigten bei der DHPLC Analyse ein identisches Elutionsprofil wie die Plasmidstandards mit dem resistenten Allel. Eine Sequenzanalyse der amplifizierten Cytochrom *b* Gen Fragmente bestätigte bei allen vier Isolaten die Anwesenheit der G143A Mutation. Damit konnte diese Mutation erstmals in einer Feldprobe von *Septoria tritici* bestätigt werden.

Eine Hybridisierung von PCR Amplikons mit allel-spezifischen Oligonukleotidsonden (AS-Hybridisierung) wurde erstmals in einem Fungizidresistenzmonitoring von KOENRAADT & JONES (1992) zur qualitativen Detektion von Benomyl Resistenz in Feldisolaten von *Venturia inaequalis* durchgeführt. Dabei wurde zunächst ein Fragment aus dem β -Tubulin Gen amplifiziert, auf eine Membran gespotted und anschließend mit allel-spezifischen Oligonukleotid-Sonden mit einer Länge von 17 bp hybridisiert. Mit dieser Methode konnte zwar keine Resistenzanalyse an Feldmischproben durchgeführt werden, dennoch war es möglich, alle bekannten Mutationen auf der Membran sichtbar zu machen. Von WHEELER et al. (1995) wurde mit der selben Technik ein Assay zur Charakterisierung der Benzimidazol Resistenz von *Rhynchosporium secalis* etabliert. Mit dieser Methode waren alle relevanten Mutationen zuverlässig und reproduzierbar detektierbar. Eine quantitative Untersuchung an Feldmischproben war auch mit diesem Markersystem nicht durchführbar. Das Prinzip der allel-spezifischen Hybridisierung hat in den letzten Jahren bei der Detektion von SNP Allelen in quantitativen PCR Analysen an Bedeutung gewonnen. Dabei werden PCR Fragmente aus dem Bereich der SNP Region amplifiziert und diese während der PCR mit allel-spezifischen Sonden hybridisiert (Molecular Beacons™, TaqMan™ Sonden). Zur Detektion der SNP Allele werden jeweils spezifische Hybridisierungssonden verwendet. Bei einer 'Multiplex Reaktion' erfolgt die AS-Hybridisierung mit unterschiedlichen allel-spezifischen Hybridisierungssonden in einer einzelnen Reaktion. Durch Kreuzhybridisierungen kann dabei allerdings die quantitative Detektionsleistung bei der SNP Diskriminierung ungünstig beeinflusst werden. Die Hybridisierung und Detektion der Fragmente erfolgt bei der quantitativen PCR Analyse in Echtzeit, d.h. während der laufenden Amplifikation. Durch die Haarnadelstruktur der Molecular Beacon™ Sonden wird die Spezifität der allelischen Hybridisierung erhöht, da erst

bei einer korrekten Basenpaarung mit der Template DNA die Haarnadelstruktur der Sonde auseinander klappt. Eine Quantifizierung Qol resistenter Allele mit allelspezifischen Molecular Beacon™ Hybridisierungssonden erfolgte bei *B. graminis* f.sp. *tritici* und *Mycosphaerella fijiensis* (WILLE et al. 2002). Mit diesem Markersystem wurden Qol resistente Allele in Feldmischproben bis zu einem Anteil von ca. 1% in der Gesamt DNA Lösung quantifiziert.

Neben der allel-spezifischen Hybridisierung besitzt die allel-spezifische Amplifikation eine große Bedeutung bei quantitativen SNP Analysen. Die Diskriminierung der SNP Allele erfolgt dabei mit allel-spezifischen ARMS PCR Primern. Mit Hilfe des Primer-Sonde Oligonukleotids 'ARMS-Scorpion' (THELWELL et al. 2000) wurde ein quantitatives Detektionsverfahren für die G143A Mutation bei *Mycosphaerella fijiensis* etabliert (HEANEY et al. 2000, WILLE et al. 2000, WILLE et al. 2002). FRAAIJE et al. (2000, 2002) entwickelten einen quantitativen PCR Ansatz zur Detektion der G143A Mutation bei *B. graminis* f.sp. *tritici*. Bei diesem Assay geschah die Diskriminierung der SNP Allele mit allel-spezifischen ARMS Primern und die Detektion der Amplikons über den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green (SCHNEEBERGER et al. 1995). Die Autoren schätzten die Nachweisgrenze für resistente Allele bei diesem Analysensystem auf ca. 0,01% in einer DNA Lösung von Feldmischproben. Da der Farbstoff SYBR Green in allen doppelsträngigen DNA Fragmenten interkaliert, besteht bei diesem System allerdings die Gefahr, dass durch Primer Dimere falschpositive Ergebnisse im unteren Detektionsbereich produziert werden.

Bei dem in dieser Arbeit vorgestellten quantitativen PCR Assay zur Detektion der G143A Mutation bei *Plasmopara viticola* erfolgte die Detektion resistenter Allele über einen allel-spezifischen ARMS-Primer. Die Erfassung der eingesetzten Cytochrom *b* Kopien geschah über ein separates PCR Referenzsystem. Die Detektion der amplifizierten Fragmente erfolgte mit sequenzspezifischen TaqMan™ Sonden. Durch die Verwendung von klonierten Kalibrationsstandards konnte eine absolute Schätzung resistenter Allele in Feldmischproben durchgeführt werden. Mit diesem Analysensystem können resistente Allele in Feldmischproben von *Plasmopara viticola* bis zu einem relativen Anteil von 0,0003% nachgewiesen, bzw. bis zu einem relativen Anteil von 0,0005% quantifiziert werden.

4.3 Validierung einer molekularen Resistenzdiagnostik

Die Validierung der CAPS Analysen bei dieser Arbeit erfolgte mit Nachkommenschaften von Einzelsporenisolaten, die zuvor mit '*in-vivo*'-Biotests auf ihre phänotypische Reaktion bezüglich QoI Fungizide getestet wurden (BÄUMLER et al. 2003a). Es wurden insgesamt 108 Isolate (10 sensitiv, 98 resistenten) von *B. graminis* f.sp. *tritici*, 118 Isolate (107 sensitiv, 11 resistent) von *B. graminis* f.sp. *hordei* und 41 Isolate (9 sensitiv, 32 resistent) von *Venturia inaequalis* mit dem CAPS Marker getestet. Bei allen drei untersuchten Pathogenen bestätigen die molekularen Ergebnisse die phänotypische Charakterisierung zu 100%. Bei allen Isolaten, die in den '*in-vivo*'-Biotests als QoI resistent charakterisiert wurden, konnte die Anwesenheit der G143A Mutation im Cytochrom *b* Gen mit dem molekularen Test bestätigt werden. Die Evaluierung der semiquantitativen Detektionsleistung resistenter Allele in Feldmischproben mit der CAPS Analyse erfolgte bei allen drei Pathogenen mit Verdünnungsreihen aus PCR Amplikons resistenter und sensitiver Standardisolate. Die als Detektionsgrenze angegebenen relativen Anteile von 10-50% bei *B. graminis* f.sp. *tritici* und *B. graminis* f.sp. *hordei*, bzw. von ca. 20% bei *Venturia inaequalis* wurden durch vier Wiederholungen der Analysen an unabhängig voneinander hergestellten Verdünnungen als reproduzierbar bestätigt. Der Einsatz eines CAPS Markersystems zur semiquantitativen Detektion resistenter Allele in Feldmischproben ist bei der angegebenen Detektionsleistung nur dann möglich, wenn der Fungizideinsatz bei diesem Resistenzniveau noch sinnvoll ist (BÄUMLER et al. 2003a). Trotz der guten Reproduzierbarkeit der CAPS Analyse bei der Detektion der G143A Mutation in allen untersuchten Pathogenen ist dieser Markertyp als Routinediagnosesystem zur Identifikation resistenter Isolate nur bedingt geeignet. Der große Arbeitsaufwand für Analysenschritte, die der PCR Amplifikation nachgeschaltet sind (Aufreinigung der Amplikons, 16 Stunden Inkubation mit dem Restriktionsenzym *NotI*, Agarosegelelektrophorese und die visuelle Auswertung), machen den hohen Probendurchsatz unmöglich, der für ein umfangreiches Resistenzmonitoring erforderlichen wäre.

Um die aufwendigen Arbeitsschritte des Restriktionsverdau bei der CAPS Analyse zu umgehen, wurde eine allel-spezifische PCR Analyse zur Detektion der G143A Mutation etabliert. Bei der allel-spezifische Amplifikation geschieht die Diskriminierung der SNP Allele über einen ARMS Primer (NEWTON et al. 1989). Aufgrund der minimalen Sequenzunterschiede der beiden allel-spezifischen Primer besteht die

Gefahr, dass während der PCR ein falsches Allel amplifiziert wird. Unter Ausnutzung der konkurrierenden Situation eines allel-spezifischen Primers mit einem zusätzlichen Primer im Reaktionsansatz wurde die Präzision der allelischen Diskriminierung wesentlich erhöht (BÄUMLER et al. 2003a). Bei diesem 'Nested PCR' Assay wurde für eine zusätzlichen Absicherung der Analyseergebnisse jeder Genotyp in einem doppelten Ansatz jeweils mit den allel-spezifischen Primern für das Wildtyp- und das mutante Allel getestet. Unter optimierten Amplifikationsbedingungen konnte mit diesem Markersystem an 37 analysierten Einzelsporenisolaten von *B. graminis* f.sp. *tritici* (8 sensitiv, 29 resistent) vollständige Korrelation mit den phänotypischen Ergebnissen aus den '*in-vivo*'-Biotests beobachtet werden. Trotz akkurater Optimierung der Reaktionsbedingungen war mit Verdünnungsreihen von PCR Amplikons resistenter und sensitiver *B. graminis* f.sp. *tritici* Isolate keine annehmbare quantitative Auswertung möglich. Die Diskriminierung resistenter und sensitiver Allele beruht auf einer einzigen korrekten oder fehlerhaften Basenpaarung zwischen dem PCR Primer und der Vorlagen DNA. Deshalb ist dieses Verfahren störungsanfällig und eine Übertragung auf veränderte Analysengeräte mitunter problematisch. Verantwortung dafür tragen vor allem die geringfügig differierenden Temperaturprofile unterschiedlicher PCR-Thermocycler. Aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit der AS-PCR Analyse wurde bei weiteren Pathogenen auf eine Etablierung dieses Markertyps zur Detektion von QoI Resistenz abgesehen.

Die DHPLC Analyse wurde als Routinediagnosesystem zur Detektion von QoI Fungizidresistenz bei mehreren Pathogenen erfolgreich auf einem Varian HelixTM DHPLC System (Varian Inc.) etabliert. Mit dieser Technik konnten Amplikons aus dem Cytochrom *b* Gen von *B. graminis* f.sp. *tritici* mit einer Größe von 465 bp (BÄUMLER et al. 2003a), von *B. graminis* f.sp. *hordei* mit 357 bp (BÄUMLER et al. 2003b), von *Venturia inaequalis* mit 460 bp, von *Septoria tritici* mit 302 bp und von *Plasmopara viticola* mit 264 bp auf die Anwesenheit der G143A Mutation erfolgreich analysiert werden. Bei allen fünf Pathogenen wurden QoI resistente und sensitive Isolate durch die An- oder Abwesenheit eines diagnostischen Heteroduplexpeaks in den Elutionsprofilen eindeutig identifiziert. Die Validierung dieses molekularen Analysenverfahrens erfolgte mit Einzelsporenisolaten der fünf Pathogene, die zuvor mit '*in-vivo*'-Biotests auf ihre phänotypische Reaktion gegenüber QoI Fungizide getestet wurden. Bei der Untersuchung von 48 *B. graminis* f.sp. *tritici* Isolaten (21 sensitiv, 27 resistent), 40 *B. grami-*

nis f.sp. *hordei* Isolaten (29 sensitiv, 11 resistent), 35 *Venturia inaequalis* Isolaten (6 sensitiv, 29 resistent), 37 *Septoria tritici* Isolaten (33 sensitiv, 4 resistent) und 22 *Plasmopara viticola* Isolaten (17 sensitiv, 5 resistent) wurde eine vollständige Übereinstimmung aller molekularer Ergebnisse mit den phänotypischen Daten festgestellt. Alle QoI resistenten Isolate dieser Pathogene besaßen die G143A Mutation im Cytochrom *b* Gen.

Ebenso wie zuvor bei den CAPS Analysen erfolgte die Evaluierung der Detektionsleistung bei der DHPLC Analyse mit Verdünnungsreihen von PCR Produkten resistenter und sensitiver Standardisolate. Bei der Analyse von jeweils drei unabhängig voneinander hergestellten Verdünnungsreihen je Pathogen wurden die Elutionsprofile auf An- oder Abwesenheit des diagnostischen Heteroduplexpeaks visuell evaluiert. Aufgrund stark ausgeprägter kohärenter Flächen der Homo- und Heteroduplexpeaks, einem hohen Hintergrundrauschen der Messsignale und schwankenden Signalintensitäten konnte keine exakte Berechnung der SNP Allelfrequenzen durch Peakhöhen oder -flächen durchgeführt werden. Infolgedessen wurde die DHPLC Analyse semi-quantitativ ausgewertet. Die Detektionsgrenze QoI resistenter Allele in Feldmischproben wurde bei allen untersuchten Pathogenen, mit Ausnahme von *Plasmopara viticola*, auf einen relativen Anteil von 20% resistenter Allele geschätzt. Eine semi-quantitative Analyse der G143A Mutation in Feldmischproben ist mit der DHPLC Analyse dann sinnvoll, wenn bei dieser Resistenzsituation der Einsatz eines QoI Fungizides gegen ein Pathogen noch sinnvoll erscheint. Ungünstige Elutionsprofile bei *Plasmopara viticola* erlaubten bei diesem Pathogen ausschließlich eine qualitative Detektion der G143A Mutation.

Die DHPLC Analyse hat sich als sehr leistungsfähige, schlagkräftige und kostengünstige Technologie für ein modernes Fungizidresistenz Management ausgezeichnet. Durch das hohe Maß an Automatisierbarkeit aller Arbeitsschritte, der Robustheit und dem hohen Probendurchsatz ist sie allen bekannten gelbasierenden Markersystemen bei der Genotypisierung von SNP Allelen überlegen. Das Primerdesign für eine DHPLC Analyse gestaltet sich sehr flexibel, da laut Hersteller der Chromatographiesäule (Varian Inc.) eine Heteroduplexanalyse mit Fragmenten im Größenbereich von 100-600 bp möglich ist. Sofern die betreffenden Nukleotidsequenzen bekannt sind, bietet sich dieses Markersystem zur Detektion aller weiterer Punktmutationen an, die in einem pilzlichen Phytopathogen Fungizidresistenz verursachen.

Außerdem erlaubt die DHPLC Technik eine Detektion von mehreren Mutationen in einem einzigen PCR Fragment (OEFNER & UNDERHILL 1998). Weitere Mutationen im Cytochrom *b* Gen, die in einem Pathogen zusätzlich zur QoI Resistenz beitragen, wären damit in einem einzigen Analysenansatz detektierbar. Bei *Plasmopara viticola* könnte bei entsprechender Konstruktion der PCR Primer eine Detektion sowohl der G143A als auch der F129L Mutation in einem einzigen Analysenschritt erfolgen. Von GROSS et al. (1999) wurde sogar berichtet, dass die Identifikation der in einem einzigen Amplikon vorhandenen Punktmutationen anhand unterschiedlicher Elutionsprofile möglich sei.

Zur Detektion sehr niedriger Frequenzen der G143A Mutation in Feldmischproben von *Plasmopara viticola* wurde ein quantitatives allel-spezifisches PCR System auf einem ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems) eingerichtet. In Anlehnung an eine praxisnahe Beprobung wurde bereits bei der Etablierung des Markersystems DNA nur aus luftgetrockneten Weinblättern mit *Plasmopara viticola* Infektion verwendet. Mit einem modifiziertem Verfahren zur Nukleinsäureaufreinigung konnte Gesamt DNA von diesen infizierten Blättern in ausreichender Menge und erforderlicher Qualität extrahiert werden. Bedingt durch den Hintergrund pflanzlicher genomischer DNA, eine uneinheitliche Anzahl von Mitochondrien pro pilzlicher Zelle und das Auftreten von 'multi copy' Cytochrom *b* Sequenzen im mitochondrialen Genom war eine Quantifizierung der Ausgangskopienzahl der Zielsequenz durch eine Messung der DNA Gesamtmenge nicht möglich. Deshalb wurde neben einem allel-spezifischen PCR System (ARMS; NEWTON et al. 1989) für das resistente Allel ein PCR Referenzsystem zur Nivellierung der eingesetzten Cytochrom *b* Kopien verwendet. Mit dieser Strategie war auch mit unterschiedlich stark befallenem Probenmaterial eine Bestimmung der relativen Anteile resistenter Allele in der Gesamt DNA Lösung möglich.

Durch die Verwendung eines Mismatch Amplification Mutation Assay (MAMA, CHA et al. 1992) mit einer zusätzliche eingeführten Basenfehlpaarung am allel-spezifischen Primer an der vorletzten Stelle des 3' Terminus wurde eine fehlerhafte Amplifikation sensitiver Allele zuverlässig unterdrückt. Aufgrund überschneidender Emissionsspektren der beiden verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe FAM und VIC und dadurch resultierendem Präzisionsverlust bei der Detektion von resistenten Allelen im niedrigen Frequenzbereich wurde davon abgesehen, beide Amplifikationen in einem einzi-

gen Reaktionsansatz durchzuführen (Multiplex PCR). Die Sonden der beiden PCR Systeme verfügten über eine Minor Groove Binder Gruppe am 3' Terminus (MGB Sonde, KUTYAVIN et al. 2000). Bei der Hybridisierung der Sonden an die Ziel DNA wird durch den MGB Mechanismus eine besonders starke Bindung ermöglicht. Dadurch konnten sehr kurze PCR Amplikons geschaffen und demzufolge bei beiden Systemen über alle Kalibrationsstufen hinweg sehr hohe und einheitliche PCR Effizienzen erreicht werden. Mit Verdünnungsreihen genomischer DNA von resistenten Standardisolaten mit Wasser wurden einheitliche Effizienzen von durchschnittlich 0,86 beim allel-spezifischen System und 0,84 beim Referenz PCR System ermittelt.

Für den Vergleich von genomischen und klonierten Kalibrationsstandards wurden PCR Produkte von QoI resistenten und QoI sensitiven Standardisolaten in einen Plasmidvektor kloniert. Mit Kalibrationsstandards aus genomischer DNA, aus Plasmid-DNA und aus Plasmid-DNA in genomischem Hintergrund wurden quantitative PCR Analysen durchgeführt und die Kalibrationsdaten sowie die PCR Effizienzen errechnet. Bei diesen Untersuchungen wurden sehr einheitliche Regressionsparameter, sowie in allen drei Fällen eine enorm hohe Präzision der Kalibrierfunktionen mit Bestimmtheitsmaßen um 0,995 ermittelt. Beim paarweisen Vergleich der drei Verdünnungsreihen wurde eine identische Amplifikationskinetik über die relativen Effizienzen der einzelnen Kalibrationen bestätigt. Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass eine Quantifizierung resistenter Allele in Feldmischproben von *Plasmopara viticola* mit klonierten Kalibrationsstandards zulässig ist.

Bei der Verwendung von genomischen Standards ist eine Lebendvermehrung entsprechender Isolate, die Nukleinsäureextraktion in großem Maßstab und ein aufwendiges Verfahren zur Nivellierung der Cytochrom *b* Kopien in den beiden DNA Lösungen notwendig. Durch die Verwendung klonierter Standards entfällt dieser enorm hohe Arbeitsaufwand. Eine besondere Funktion erfüllten die Plasmidstandards bei der Validierung der Detektionsleistung der quantitativen PCR Analyse. Bei den genomischen Kalibrationsstandards ist neben der mitochondrialen DNA auch genomische DNA aus Pflanze und Pathogen vorhanden. Deshalb ist eine Quantifizierung der Cytochrom *b* Kopien durch eine Messung der DNA Gesamtmenge unmöglich. Klonierte DNA Standards können in nahezu beliebiger Menge hergestellt und die Kopienzahlen über die Plasmidkonzentration einfach berechnet werden.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode zur Berechnung von Vertrauensbereichen der Kalibration erfolgte nach der DIN53804 (DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMIERUNG, 2002). Für eine korrekte Quantifizierung fordert die DIN53804 Prognoseintervalle der Kalibrationsstufen mit einer maximalen relativen Schwankung von 33%. Diese Schwelle wurde bei dem hier vorgestellten Analysensystem über den gesamten Kalibrationsbereich nicht überschritten. Die Berechnungen der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen resistenter Allele erfolgte nach der Leerwertmethode der DIN32645 (DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMIERUNG, 1994). Die Nachweisgrenze markiert die Schwelle, ab der in der Hälfte der Fälle tatsächlich resistente Allele in der DNA Lösung detektiert werden können. Mit dem hier beschriebenen quantitativen PCR Assay wurde eine Nachweisgrenze von 92 Kopien resistenter Allele ermittelt. Dies entspricht bei 30.000.000 eingesetzten Cytochrom *b* Kopien pro qPCR Ansatz einem relativen Anteil von 0,0003%. Die Erfassungsgrenze, ab der nach DIN32645 eine Detektion resistenter Allele mit einer gegebenen Signifikanz möglich ist beträgt 122 Kopien, was bei der oben angegebenen Anzahl an Cytochrom *b* Kopien in einem qPCR Ansatz einem relativen Wert von 0,0004% entspricht. Die Bestimmungsgrenze, ab der nach DIN32645 eine quantitative Bestimmung resistenter Allele in der DNA Lösung zulässig ist, beträgt bei diesem Assay 162 Kopien. Dies entspricht bei 30.000.000 Cytochrom *b* Kopien einem relativen Anteil von 0,0005%. Die hier angegebenen Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen resistenter Allele wurden mit klonierten Standards evaluiert. Diese Plasmidstandards wurden auf eine Konzentration von 10^7 Kopien/ μ l eingestellt. Diese Verdünnung entspricht der Konzentration an Cytochrom *b* Kopien in den genomischen DNA Lösungen der Standardisolate, was über identische Ct-Werte des Referenz PCR Systems bewiesen wurde. Alle bei der DNA Isolation verwendeten Weinblätter waren ausreichend mit *Plasmopara viticola* infiziert. Feldmischproben können allerdings schwächere Infektionsraten aufweisen. Die hier angegebenen Detektionsgrenzen gelten für 30.000.000 Cytochrom *b* Kopien in einem qPCR Ansatz. Eine niedrigere Infektionsrate in einer Feldprobe von *Plasmopara viticola* würde in einer entsprechend geringeren Konzentration an Cytochrom *b* Kopien in der DNA Lösung resultieren. Daraus folgt eine ungünstigere relative Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze für resistente Allele bei schwach infiziertem Probenmaterial. Um die volle Sensitivität dieses Diagnosesystems nutzen zu können, muss deshalb bei der Probenahme auf ausreichend hohe Infektionsraten bei den beprobten Weinblättern geachtet werden.

Bei der Quantifizierung von Kopien bestimmter Gensequenzen in einer genomischen DNA Lösung sind die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen auch von der Genomgröße der untersuchten Spezies abhängig. Der DNA Gehalt eines haploiden Chromosomensatzes in einem Organismus wird als 1C Wert definiert (ARUMUGANATHAN & EARLE 1991). Bei üblicherweise verwendeten 100 ng Template DNA pro Amplifikationsansatz und einem 1C Gewicht von 3,476 Picogramm im Humangenom entspricht dies 29.026 Kopien pro PCR Ansatz (database of genome sizes: www.cbs.dtu.dk/databases/dogs). Eine einzelne eingesetzte Kopie des haploiden Genoms entspricht demnach 0,0035%. Errechnete Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen unterhalb dieses Wertes sind ungültig, da die DNA Zielsequenz in diesem Bereich nicht mehr reproduzierbar detektiert werden kann. Bei der geringen Größe von mitochondrialen Genomen im Bereich von unter 0,01 Picogramm liegen die angegebenen Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen zur Detektion Qol resistenter Allele in *Plasmopara viticola* in jedem Fall außerhalb des kritischen Bereichs.

Tabelle 18: Übersicht über die relativen Nachweisgrenzen resistenter Allele in Feldmischproben mit molekularen Diagnosetechniken

Markertyp	Pathogen	Rel. Nachweisgrenze
CAPS	<i>B. graminis</i> f.sp. <i>tritici</i>	10-50%
	<i>B. graminis</i> f.sp. <i>hordei</i>	10-50%
	<i>V. inaequalis</i>	~20%
AS-PCR	<i>B. graminis</i> f.sp. <i>tritici</i>	100% ¹
DHPLC	<i>B. graminis</i> f.sp. <i>tritici</i>	20%
	<i>B. graminis</i> f.sp. <i>hordei</i>	20%
	<i>V. inaequalis</i>	20%
	<i>S. tritici</i>	20%
	<i>P. viticola</i>	100% ¹
Quantitative ARMS-PCR	<i>P. viticola</i>	0,0003%

¹Nur qualitative Auswertung möglich

Mit dem in dieser Arbeit beschriebenen Modell wird eine Methode vorgestellt, bei der die Detektionsleistung einer quantitativen PCR Analyse nach statistischen Normen evaluiert wird. Dieses Modell ist auf andere SNP Quantifizierungsexperimente mit

quantitativer PCR Technologie übertragbar, jedoch eignet es sich nicht zur Ermittlung dieser Parameter bei Analysen, in denen die Leerprobe kein Messsignal liefert. SCHWARZ et al. (2004) schlagen in diesem Fall eine Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze über die Varianzen der Kalibrationsstufen nach DIN32645 vor. Bei der Quantifizierung transgener Anteile in Lebens- und Futtermitteln wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenze über die relativen Vertrauensbereiche der Kalibrationsstufen festgesetzt. Nach diesem Verfahren markiert die Kalibrationsstufe mit einer Varianz von 100% die Nachweis- und die Stufe mit einer Varianz von 30% die Bestimmungsgrenze des Analysensystems (HÜBNER et al. 2001, BLOCK et al. 2003).

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellte quantitative PCR Analyse eignet sich sehr gut zur Detektion niedriger Frequenzen Qol resistenter Allele in Feldmischproben von *Plasmopara viticola*. Damit steht ein kostengünstiges neues Analysenverfahren für ein Resistenzmonitoring mit hohem Probendurchsatz und bisher nicht erreichter Sensitivität zur Verfügung (**Tabelle 18**). Einige wenige resistente Genotypen in großen Mengen infizierten Probenmaterials, beispielsweise aus der Beprobung einer kompletten Anbauregion, können mit diesem Markersystem in nur einer einzigen Analyse identifiziert werden. Darüber hinaus eröffnet die besondere Detektionsleistung dieser Analysenmethode neue Möglichkeiten zur Identifikation von mitochondrialen heteroplasmatischen Mischisolaten. Da pilzliche Zellen mehrere hundert Mitochondrien tragen können, sind durchaus Individuen vorstellbar bei denen innerhalb einer einzigen Zelle Qol resistente und sensitive Allele anzutreffen sind. Es wird angenommen, dass solche Mischtypen entweder durch spontan auftretende Mutationen entstehen oder nach einer sexuellen Vermehrung von Isolaten, mit entsprechend unterschiedlicher Allelkonstellation hervorgehen können (ROBINSON et al. 2002). Wenn die Anwesenheit einer solchen Mutation keinen Fitness Nachteil mitbringt, ist unter entsprechendem Selektionsdruck eine Zunahme von fungizidresistenten Allelen in den Mitochondrien innerhalb einer pilzlichen Zelle vorstellbar. Dies könnte eine latente Zunahme resistenter Allele noch vor dem Auftauchen erster phänotypisch resistenter Individuen in einer Pathogenpopulation bedeuten. Weil Analysenmethoden mit entsprechender Sensitivität bisher nicht zur Verfügung standen, konnte das Umschwenken von einem phänotypisch fungizidsensitiven zu einem resistenten Isolat bisher noch bei keinem einzigen Pathogen auf mitochondrialer Ebene verfolgt werden. Mit dem hier beschriebenen quantitativen PCR Markersystem zur Detektion

QoI resistenter Allele von *Plasmopara viticola* können populationsgenetische Zusammenhänge in der epidemiologischen Entwicklung einer Fungizidresistenz besser erforscht werden.

Den Nutzen quantitativer PCR Markersysteme für ein Resistenzmonitoring demonstrieren auch die Untersuchungen von FRAAIJE et al. (2002). Mit einem quantitativen PCR Assay wurde die Entwicklung resistenter Allele in Feldpopulationen von *B. graminis* f.sp. *tritici* vor und nach der Anwendung von QoI Fungiziden verfolgt. Es konnte gezeigt werden, dass die Frequenz resistenter Allele durch den Selektionsdruck von drei QoI Applikationen von 2,2 auf 58% anstieg. Diese Ergebnisse demonstrieren, wie mit einer quantitativen PCR Analyse eine Früherkennung resistenter Genotypen erfolgen und die weitere Entwicklung in der pilzlichen Pathogenpopulation beobachtet werden kann.

4.4 Einsatzmöglichkeiten molekularer Diagnosesysteme innerhalb eines Fungizidresistenz Monitorings

Viele Strategien der Fungizidhersteller zielen darauf, die Bildung von Resistenzen in pilzlichen Phytopathogenen zu verzögern. Zu diesem Zweck werden schon seit langer Zeit Resistenzuntersuchungen mit Hilfe von 'in vivo'-Biotests durchgeführt. Solche Biotests sind auch bekannt zur Identifikation QoI resistenter Isolate von *B. graminis* (CHIN et al. 2001), *Venturia inaequalis* (HEANY & LORENZ 1997; OLAYA & KÖLLER 1999; KÜNG FÄRBER et al. 2002), *Septoria tritici* (HEANY & LORENZ 1997), *Plasmopara viticola* (HEANY et al. 1997) und *Mycosphaerella fijiensis* (CHIN et al. 2000b). Basierend auf den mit diesen Tests gewonnenen Kenntnissen werden die Anwendungsempfehlungen für die Wirkstoffe ständig überarbeitet, um in jeder Anbauregion einen situationsgerechten Fungizideinsatz gewährleisten zu können. Trotz dieser Vorkehrungen konnten sich immer wieder Fungizidresistenzen bei Pathogenen ausbreiten. Dies hat oft zu enttäuschenden Ergebnissen bei der Krankheitsbekämpfung unter Feldbedingungen geführt.

Zu Beginn der Bildung einer Fungizidresistenz ist der Anteil resistenter Individuen in einer Feldpopulation sehr niedrig. Resistente Genotypen sind mit konventionellen Testmethoden nur sehr schwer zu identifizieren. Ein großes Ziel in einem modernen Fungizidresistenzmanagement besteht aber darin, Resistenzfaktoren bereits in sehr

niedrigen Frequenzen in der Pathogenpopulation identifizieren zu können. Der Fortgang der Anpassung der Erregerpopulation soll zuverlässig verfolgt und neue Anwendungsempfehlungen für einen Wirkstoff rechtzeitig aktualisiert werden können. Ein modernes Resistenzmonitoring benötigt demzufolge hochsensitive Diagnosesysteme für entsprechende Veränderungen in den Pathogenpopulationen. Die gewünschte hohe Sensitivität kann mit klassischen Bioassays auch unter optimierten Testbedingungen nicht erreicht werden. Als eine Alternative zu den konventionellen Methoden wurde ein vermehrter Einsatz PCR-gestützter Markersysteme schon vor Jahren proklamiert (JUTSUM et al. 1998). Molekulare Markertechniken sind bereits auf mehreren Gebieten der Phytopathologie erfolgreich eingesetzt worden. Applikationen sind bekannt zur Pathogenidentifizierung wie beispielsweise von *Stagnospora nodorum* (BECK & LIGON 1995) und von verschiedenen *Tapesia* Spezies (NICHOLSON et al. 1997), zur Analyse der genetischen Variation von Pathogenen wie bei *Puccinia recondita* (PARK et al. 2000), zur Bestimmung des Mating Types von *Pyrenopeziza brassicae* (FOSTER et al. 1999), zur Ermittlung von Fungizideffizienzen bei verschiedenen *Fusarium* Arten (DOOHAN et al. 1999) und in der Pflanzenzüchtung zur Identifikation von Resistenzgenen in Kulturpflanzen (TANKSLEY 1983; MOHLER et al. 2001).

In den allermeisten Fällen bewerkstelligen Veränderungen im Angriffsort des Wirkstoffs, die Möglichkeit einer By-pass Reaktion am Wirkungsort, sowie veränderte Influx/Efflux Verhältnisse an Biomembranen in einem Pathogen verminderte Fungizidsensitivität. Zur Identifikation der verantwortlichen Mutationen in einem Organismus müssen dementsprechend die biochemische Wirkungsweisen des fungiziden Wirkstoffs, sowie die molekularen Grundlagen der Resistenzen ausreichend erforscht werden. Die Grundlage bei der Detektion von Fungizidresistenzen mit molekularen Markersystemen bildet die DNA des Pathogens als Träger der genetischen Information. Das Gen oder die Gene eines Pathogens, die für das Zielprotein eines Fungizids kodieren und die entsprechenden Mutationen in diesen Gensequenzen, die einem Individuum Fungizidresistenz verleihen, müssen bekannt sein. Erst dann können molekulare DNA Markersysteme für eine rasche und zuverlässige Detektion der Resistenzfaktoren etabliert werden.

Ein molekulares Markersystem ist nur dann von praktischem Wert, wenn die Ergebnisse mit den 'in vivo'-Biotests sehr hohe Korrelationen aufweisen (BRENT 1986, ANONYM 1986). Die detektierbaren Mutationen sollen möglichst alle Faktoren erfassen

sen, die an der phänotypischen Ausprägung der Resistenz beteiligt sind. Eine Applikation von DNA Markern zur Detektion von Fungizidresistenzen ist folglich nur dann sinnvoll, wenn die Resistenz durch nur eine einzige oder wenige Mutation verursacht wird. Bei einer polygen vererbten Fungizidresistenz kann mit den Analyseergebnissen eines überschaubaren Markersatzes keine zufriedenstellende Korrelation mit dem Phänotyp eines Pathogens erzielt werden. In solchen Fällen wird man auch in Zukunft nicht auf Biotests für ein aussagekräftiges Resistenzmonitoring verzichten können. Die klassischen '*in-vivo*' Testmethoden erfassen vollständig alle phänotypisch exprimierten Resistenzfaktoren. Molekulare Markersysteme können in Resistenzuntersuchungen gegenüber MBC- und DMI-Fungiziden helfen, mutierte Allele in Feldpopulationen bereits in sehr niedrigen Frequenzen zu identifizieren. Eine aussagekräftige Resistenzanalyse unter Berücksichtigung aller möglichen auftretenden Resistenzmechanismen ist bei diesen Fungizidgruppen jedoch alleine mit molekularen DNA Markern nicht möglich. Bei MBC- und DMI-Fungiziden bleiben Biotests auch weiterhin das wichtigste Instrument für ein zielgerechtes Resistenzmanagement.

Die Untersuchungsergebnisse konventioneller '*in-vivo*' Biotests basieren auf der phänotypischen Merkmalsausprägung, der Bildung von pathogenspezifischen Krankheitssymptomen resistenter Pathogenisolate auf der Wirtspflanze. Die Präzision und Reproduzierbarkeit eines solchen Verfahrens hängt dabei von der Erfahrung und dem Geschick des durchführenden Personals ab. Die notwendigen Arbeitsschritte zur Isolaterhaltung und -vermehrung, Applikation der Wirtspflanze mit dem zu testenden Wirkstoff, Inokulation mit dem Pathogen und schließlich die Inkulturnahme des Wirt/Pathogen Systems in einer adäquaten Umgebung beanspruchen einen großen Arbeits- und Zeitaufwand. Minimale abiotische Veränderungen im Analyseverfahren können einen Einfluss auf die Wirt/Pathogen Interaktionen ausüben und Ergebnisse verfälschen. Molekulare Testmethoden beschränken sich ausschließlich auf die vorliegende genetische Information, auf die DNA des untersuchten Pathogens. Daraus resultiert die herausragende Spezifität und Reproduzierbarkeit der molekularen Markersysteme. Vor allem PCR basierende DNA Marker sind dazu geeignet, selbst Spuren von DNA, wie etwa aus einer einzigen pilzlichen Spore zuverlässig zu detektieren (LEE & TAYLOR 1990).

Resistenzuntersuchungen mit '*in-vivo*' Biotests werden an lebendem Pilzmaterial durchgeführt. Viele bedeutende Krankheitserreger an Kulturpflanzen, wie z.B. alle

Echten Mehлтаupilze, sind obligat biotrophe Organismen. Die Pathogenisolate müssen deshalb vor der eigentlichen Resistenzanalyse ununterbrochen mit frischem Wirtsgewebe versorgt werden. Bei einer Untersuchung von Feldisolaten aus unterschiedlicher regionaler Beprobung ist solch eine Isolaterhaltung mit einem sehr hohen Arbeits- und Zeitaufwand verbunden. Eine regelmäßige Überimpfung auf frisches Wirtsgewebe, sowie die Einhaltung artspezifischer Wachstums- und Klimabedingungen ist obligatorisch. Bei der Erhaltung der Pathogenkollektionen ist zudem die Gefahr einer Verschleppung von Sporenmaterial zwischen den Feldproben nicht auszuschließen.

Obwohl '*in-vivo*' Biotests seit langer Zeit für Fungizidresistenz-Studien eingesetzt werden, ist die Durchführung dieser Diagnoseverfahren bei manchen Pathogenen immer noch sehr problematisch. Die Bildung spezifischer Krankheitssymptome verläuft bei einigen Pathogenen, wie bei *Venturia inaequalis*, oft sehr schwach. Bei Sporenmaterial, das durch längere Lagerung oder Transport in der Vitalität geschwächt ist, können sehr niedrige Infektionsraten eine zuverlässige visuelle Bonitur von Befallsergebnissen erschweren. Manche Pathogene, wie *Septoria tritici*, weisen sehr lange Inkubationszeiten auf. Eine zügige Durchführung von Resistenzuntersuchungen mit großem Probenumfang ist bei solchen Pathogenen nur mit ausreichenden Kapazitäten in den Klimaräumen möglich.

Molekulare Testmethoden stellen erheblich niedrigere Anforderungen an das Probenmaterial. Als Ausgangsmaterial für eine Markeranalyse dient gefrorenes, getrocknetes oder frisches Pilzmaterial in Reinkultur oder in Form von infiziertem Wirtsgewebe. Die Beprobung der Pathogenisolate wird dadurch stark vereinfacht und eine Lebenderhaltung ist nicht mehr nötig. Getrocknetes infiziertes Pflanzenmaterial kann unkompliziert ins Analysenlabor geschickt und dort unverzüglich mit der DNA Isolation begonnen werden. Weil DNA auch in getrocknetem oder gefrorenem biologischem Material dauerhaft stabil erhalten bleibt, kann die Probeneinlagerung im Analysenlabor stark vereinfacht werden. Das Wegfallen aufwendiger Erhaltungs- und Vermehrungsschritte '*in vivo*' entfällt. Durch die einfache Handhabung der Proben für anschließende molekulare Untersuchungen kann der Arbeitsaufwand im Resistenzlabor drastisch gesenkt werden. Die lokale Unabhängigkeit bei der Beprobung eröffnet zudem die Möglichkeit, ein Monitoring auf globale Maßstäbe auszudehnen.

Bei einer molekularen Diagnostik wird nach der DNA Isolation aus lebendem oder totem Pathogenmaterial mit der eigentlichen Detektion der für die Fungizidresistenz verantwortlichen Mutationen begonnen. Eine moderne Laborausstattung erlaubt dabei eine starke Automatisierung vieler Arbeitsschritte. Die Probenaufarbeitung, die DNA Isolation, die Mutationsanalyse und die Rohdatenauswertung benötigt auch bei einigen hundert Isolaten nur wenige Tage. Viele moderne Analysengeräte sind bereits auf einen hohen Probendurchsatz ausgelegt. Bei der im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen DHPLC Analyse, sowie bei der quantitativen PCR Analyse konnte sowohl die DNA Isolation als auch die eigentliche Mutationsanalyse in einem ergonomischen 96er PCR Plattenformat durchgeführt werden. Die Datenauswertung erfolgte bei beiden Markersystemen computerunterstützt.

Wenn mit einem '*in vivo*'-Biotest geringe Frequenzen von resistenten Allelen in einer Feldpopulation ermitteln werden sollen, so ist mit einem enormen Anstieg der Probenmenge zu rechnen. Um mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% ein resistentes Isolat von *B. graminis* f.sp. *tritici* mit einer Allelfrequenz von 1% in einer Feldmischprobe detektieren zu können, müssen 300 Isolate vereinzelt und separat getestet werden (BRENT & HOLLOMON 1998). Dagegen kann mit der in dieser Arbeit vorgestellten quantitativen allel-spezifischen PCR Analyse die G143A Mutation in Feldmischproben von *Plasmopara viticola* bis zu einem relativen Anteil von 0,0003% detektiert und bis zu einem relativen Anteil von 0,0005% zuverlässig quantifiziert werden. Der enorm große Detektionsbereich dieses Markersystems erlaubt sowohl eine Früherkennung von Resistenzfaktoren als auch eine zuverlässige, schnelle und kostengünstige Weiterverfolgung resistenter Allele in den Pathogenpopulationen.

Entscheidend beim Vergleich molekularer Marker mit konventionellen '*in vivo*'-Biotests ist die Wirtschaftlichkeit beider Systeme. Vor dem Einstieg in eine molekulare Resistenzdiagnostik steht zunächst ein hoher Investitionsaufwand. Der Aufwand für das Verbrauchsmaterial in einem PCR Labor übersteigt die Materialkosten der konventionellen Tests um ein Vielfaches. Den entscheidenden Vorteil dagegen birgt der enorm hohe Probendurchsatz der weitgehend automatisierbaren molekularen Methoden gegenüber den enorm arbeits- und zeitaufwendigen konventionellen Verfahren. Der enorm hohe Probendurchsatz der molekularen Techniken, mit einem vergleichsweise niedrigen Arbeitsaufwand je Datenpunkt trägt zu einer deutlichen Senkung der Kosten eines Resistenzmonitorings bei. Bei den im Rahmen dieser Ar-

beit etablierten DHPLC Markersystemen zur Detektion QoI resistenter Isolate in den beschriebenen Pathogenen entsprechen die Gesamtkosten der molekularen Resistenzanalyse bei einem Isolat in etwa der gleichen Größenordnung wie bei den konventionellen Methoden. Dagegen bieten die molekulare Tests eine günstigere Reproduzierbarkeit, eine schnellere Analysendurchführung sowie die Möglichkeit der semiquantitativen Auswertung von Feldmischproben. Die DHPLC Technologie basiert auf der in der chemischen Analytik sehr weit verbreiteten HPLC Methode. Daraus entstand ein robustes, kostengünstiges und weitgehend automatisierbares System zur Detektion von Punktmutationen. Dem weitaus höheren Kosten- und Arbeitsaufwand bei den quantitativen PCR Analysen steht die enorme Detektionsleistung resistenter Allele in Feldmischproben gegenüber. Die mit dieser Technik erreichte Präzision und Sensitivität kann auch durch konventionelle Resistenzanalysen von mehreren hundert Einzelsporenisolaten nicht erreicht werden.

Es besteht weltweit ein zunehmender ökonomischer und ökologischer Druck, den Aufwand an Agrochemikalien einzuschränken. Dazu werden seit langer Zeit populationsgenetische Studien an den pilzlichen Phytopathogenen durchgeführt, um die Ausbreitung der Fungizidresistenzen verfolgen und Anwendungsempfehlungen für Wirkstoffe ständig aktualisieren zu können. Der kommerzielle Einsatz molekularer Markersysteme bei Resistenzanalysen kann bisher nur sehr eingeschränkt beobachtet werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mutationen, die Resistenz gegenüber QoI Fungizide verleihen, mit molekularen Markersystemen direkt am Erbgut der Phytopathogene detektiert werden können. Durch die vielen entscheidenden Vorteile der molekularen Methoden kann die Dynamik der Entwicklung von QoI Resistenzen in pilzlichen Pathogenpopulationen viel präziser verfolgt werden. Bei den aktuellen hohen ökonomischen und ökologischen Ansprüchen eines modernen Fungizidresistenzmanagements kann zukünftig auf molekulare Diagnosesysteme nicht mehr verzichtet werden.

5 Zusammenfassung

Eine Punktmutation im mitochondrialen Cytochrom *b* Gen von pilzlichen Phytopathogenen verleiht Resistenz gegenüber QoI Fungizide. Diese Mutation verursacht einen Aminosäureaustausch von Glycin durch Alanin an der Position 143 im Cytochrom *b* Protein, das in der pilzlichen Zellatmung beteiligt ist. Obwohl weitere Resistenzmechanismen beschrieben worden sind, ist die G143A Mutation bei allen pilzlichen Schaderregern die mit Abstand effektivste und am weitesten verbreitete Form von QoI Resistenz. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten molekulare Diagnosesysteme zur Detektion dieser Punktmutation im mitochondrialen Cytochrom *b* Gen bei verschiedenen pilzlichen Phytopathogenen etabliert werden. Diese Markersysteme wurden anschließend auf ihre Eignung als Routinediagnosesystem in einem Fungizidresistenzmonitoring beurteilt. Ferner erfolgte eine Evaluierung der quantitativen Detektionsleistung dieser Markersysteme zur Identifikation resistenter Allele in Feldmischproben.

Mit einer CAPS Analyse konnte die G143A Mutation in Einzelsporenisolaten von *B. graminis* f.sp. *tritici*, *B. graminis* f.sp. *hordei* und *Venturia inaequalis* zuverlässig detektiert werden. Eine Identifikation von resistenten Allelen bis zu einem relativen Anteil von 10-50% in Feldmischproben ist mit der CAPS Analyse möglich. Der hohe Arbeitsaufwand bei diesem Markertyp erlaubt allerdings keinen Einsatz als Routinediagnosesystem mit hohem Probendurchsatz. Ein allel-spezifischer PCR Marker erlaubte eine schnelle qualitative Detektion der G143A Mutation in Einzelsporenisolaten von *B. graminis* f.sp. *tritici*.

Als Routinediagnosesystem für die G143A Mutation wurde die DHPLC Analyse bei *B. graminis* f.sp. *tritici*, *B. graminis* f.sp. *hordei*, *Venturia inaequalis*, *Septoria tritici* und *Plasmopara viticola* eingerichtet. Die DHPLC Technik erlaubte eine schnelle, kostengünstige und zuverlässige Genotypisierung von SNP Allelen bei einer starken Automatisierung aller Arbeitsschritte. Eine Detektion von resistenten Allelen in Feldmischproben war mit diesem Markersystem mit Ausnahme von *Plasmopara viticola* bei allen untersuchten Pathogene bis zu einem relativen Anteil von 20% möglich. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden im Herbst 2002 mit der DHPLC Analyse erstmals Feldisolate von *Septoria tritici* identifiziert, die eine G143A Mutation besitzen. Die entsprechende Punktmutation im Cytochrom *b* Gen konnte durch Sequenzanalysen bestätigt werden. Die DHPLC Analyse wird als Routinediagnosesystem zur

Detektion von weiteren Punktmutationen vorgeschlagen, die in pilzlichen Phytopathogenen Fungizidresistenz verursachen.

Zur Detektion sehr geringer Frequenzen QoI resistenter Allele in Feldmischproben von *Plasmopara viticola* wurde eine quantitative allel-spezifische PCR Analyse etabliert. Neben dem allel-spezifischen ARMS PCR System diente ein Referenz PCR System zur Nivellierung unterschiedlicher Cytochrom *b* Kopien in den DNA Lösungen von Feldproben. Mit einem optimierten DNA Isolationsverfahren konnte aus getrockneten infizierten Weinblättern Gesamt DNA gewonnen werden, bei der keinerlei Matrixeffekte in der PCR Amplifikation auftreten. Von beiden Allelen wurden klonierte Plasmidstandards hergestellt. Ausführliche Untersuchungen bestätigten eine identische Amplifikationskinetik bei klonierten und genomischen DNA Standards. Zur Quantifizierung resistenter Allele in anonymen Feldmischproben konnten demzufolge klonierte Kalibrationsstandards verwendet werden. Durch den Einsatz von klonierten Standards wird eine schnelle und kostengünstige Quantifizierung resistenter Allele ermöglicht. Aus Verdünnungsreihen mit relativen Anteilen resistenter Allele von 100% - 0,001% resultierten Gesamt PCR Effizienzen von 0,87. Die Kalibrierfunktionen erreichten eine hohe Präzision mit Bestimmtheitsmaßen von durchschnittlich 0,995. Die Berechnung von Vertrauensbereichen der Kalibrationsstufen bei der quantitativen allel-spezifischen PCR Analyse geschah nach DIN 53804-1. Über den gesamten Messbereich betrug die relative Ergebnisunsicherheit weniger als 33%. Die Berechnung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erfolgte nach der Leerwertmethode der DIN 32645. Die Nachweisgrenze der quantitativen allel-spezifischen PCR Analyse betrug 92 resistente Kopien. Dies entspricht einem relativen Anteil von 0,0003% resistenter Allele in Feldmischproben von *Plasmopara viticola*. Die Bestimmungsgrenze, ab der resistente Allele quantifiziert werden können, betrug 162 Kopien. Dies entspricht einem relativen Anteil von 0,0005% resistenter Allele in der DNA Lösung.

Mit der quantitativen allel-spezifischen PCR Analyse steht ein kostengünstiges neues Analysenverfahren für ein Resistenzmonitoring mit hohem Probendurchsatz und bisher nicht erreichter Sensitivität zur Verfügung. Einige wenige resistente Genotypen in großen Mengen infizierten Probenmaterials, beispielsweise aus der Beprobung einer kompletten Anbauregion, können mit diesem Diagnosesystem in nur einer einzigen Analyse identifiziert werden.

6 Literaturverzeichnis

- AHMADIAN A, GHARIZADEH B, GUSTAFSSON AC, STERKY F, NYREN P, UHLEN M, LUNDEBERG J (2000). Single nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. *Anal Biochem* **280**, 103-110
- AMMERMANN E, LORENZ G, SCHELBERGER K, MUELLER B, KIRSTGEN R, SAUTER H (2000). BAS 500 F - the new broad-spectrum strobilurin fungicide. In: Proc Brighton Crop Protect Conf - Pests and Diseases, BCPC, Farnham, Surrey, UK, pp541-548
- AMMERMANN E, LORENZ G, SCHELBERGER K, WENDEROTH B, SAUTER H, RENTZEA C (1992). BAS 490 F - a broad spectrum fungicide with a new mode of action. In: Proc Brighton Crop Protect Conf - Pests and Diseases, BCPC, Farnham, Surrey, UK, pp403-410
- ANKE T, OBERWINKLER F, STEGLICH W, SCHRAMM G (1977). The strobilurins - new antifungal antibiotics from the basidiomycete *Strobilurus tenacellus*. *J Antibiot* **30**, 806-810
- ANONYM (1986). In: Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management. National Academy Press, Washington, 271-278
- ANONYM (1996). DNA-based approaches for diagnosis of fungicide resistance in phytopathogenic fungi. www.niaes.affrc.go.jp/annual/r1996/fr_html/96fr11.htm
- ANONYM (2001). Fungicides cereales, leaflet produced by Institut Technique des Cereales et des Fourrages. France, ISBN 2.86492.435.8
- ARUMUGANATHAN K, EARLE ED (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep* **9**, 208-218
- BÄUMLER S, FELSENSTEIN FG, SCHWARZ G (2003b). CAPS and DHPLC Analysis of a Single Nucleotide Polymorphism in the Cytochrome *b* Gene Conferring Resistance to Strobilurins in Field Isolates of *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*. *J Phytopathol* **151**, 149-152
- BÄUMLER S, SIEROTZKI H, GISI U, MOHLER V, FELSENSTEIN FG, SCHWARZ G (2003a). Evaluation of *Erysiphe graminis* f sp *tritici* field isolates for resistance to strobilurin fungicides with different SNP detection systems. *Pest Manag Sci* **59**, 310-314
- BECK JJ, LIGON JM (1995). Polymerase chain reaction assays for the detection of *Stagnospora nodorum* and *Septoria tritici* in wheat. *Phytopathology* **85**, 319-324
- BECKER WF, VON JAGOW G, ANKE T, STEGLICH W (1981). Oudemansin, strobilurin A, strobilurin B and myxothiazol: new inhibitors of the *bc1* segment of the respiratory chain with an E-beta-methoxyacrylate system as common structural element. *FEBS Lett* **123**, 329-333.
- BIRNBOIM HC, DOLY J (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1522
- BLOCK A, SCHWARZ G (2003). Validation of different genomic and cloned DNA calibration standards for construct-specific quantification of LibertyLink in rapeseed by real-time PCR. *Eur Food Res Technol* **216**, 421-427
- BRASSEUR G, SARIBAS AS, DALDAL F (1996). A compilation of mutations located in the cytochrome *b* subunit in the bacterial and mitochondrial *bc1* complex. *Biochim Biophys Acta* **1275**, 61-69
- BRENT KJ (1986). In: Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management. National Academy Press, Washington, 298-312
- BRENT KJ, HOLLOMON DW (1998). Fungicide resistance: the assessment of risk. Global Crop Protection Federation, FRAC Monograph No.2, Brussels, Belgium
- BROOKES AJ (1999). The essence of SNPs. *Gene* **234**, 177-186
- BUTTERS J, HOLLOMON DW (1998). 7th International Congress of Plant Pathology, Edinburgh, abstract 3.3.49, www.bspp.org.uk/icpp98/3.3/49.html
- CHA RS, ZARBL H, KEOHAVONG P, THILLY WG (1992). Mismatch amplification mutation assay (MAMA): application to the *c-H-ras* gene. *PCR Methods Appl* **2**, 14-20
- CHIN KM, CHAVAILLAZ D, KÄSBOHRER M, STAUB T, FELSENSTEIN FG (2001). Characterizing resistance risk of *Erysiphe graminis* f sp *tritici* to strobilurins. *Crop Prot* **20**, 87-96

- CHIN KM, KÜNG FÄRBER R, LAIRD D (2000a). Aspects of fungicide cross-resistance and implications for strobilurins. In: Proc Brighton Crop Protect Conf - Pests and Diseases, BCPC, Farnham, Surrey, UK, pp415-420
- CHIN KM, WIRZ M, LAIRD D (2000b). Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* to trifloxystrobin. *Plant Dis* **85**, 1264-1270
- CHO RJ, MINDRINOS M, RICHARDS DR, SAPOLSKY RJ, ANDERSON M, DRENKARD E, DEWDNEY J, REUBER TL, STAMMERS M, FEDERSPIEL N, THEOLOGIS A, YANG W-H, HUBBELL E, AU M, CHUNG EY, LASHKARI D, LEMIEUX B, DEAN C, LIPSHUTZ RJ, AUSUBEL FM, DAVIS RW, OEFNER PJ (1999). Genome-wide mapping with biallelic markers in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet* **23**, 203-207
- CLOUGH JM, GODFREY CRA (1998). The strobilurin fungicides. In: Fungicidal activity, chemical and biological approaches to plant protection, ed by Hutson DH and Miyamoto J, Wiley Series in Agrochemicals and Plant Protection, John Wiley & Sons pp 109-148
- COENEN A, CROFT JH, SLAKHORST M, DEBETS F, HOEKSTRA R (1996). Mitochondrial inheritance in *Aspergillus nidulans*. *Genet Res* **67**, 93-100
- COOKE LR, MCKAY GJ (1999). PCR-based detection of TBZ resistance in *Helminthosporium solani*. www.afsni.ac.uk/News/PPS/PCR/default.html
- DAVIDSE LC, ISHII H (1995). Biochemical and molecular aspects of the mechanisms of action of benzimidazoles, N-phenylcarbamates and N-phenylformamidoximes and the mechanisms of resistance to these compounds. In: Modern Selective Fungicides, ed by: Lyr H. Gustav Fischer, Jena, 305-322
- DEGLI ESPOSTI M, DE VRIES S, CRIMI M, GHELLI A, PATARNELLO T, MEYER A (1993). Mitochondrial cytochrome *b*: evolution and structure of the protein. *Biochim Biophys Acta* **1143**, 243-271
- DELYE C, BOUSSET L, CORIO-COSTET M-F (1998). PCR cloning and detection of point mutations in the eburicol 14 α -demethylase (*CYP51*) gene from *Erysiphe graminis* f sp hordei a 'recalcitrant' fungus. *Curr genet* **34**, 399-403
- DELYE C, LAIGRET F, CORIO-COSTET M-F (1997). A mutation in the 14 α -demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. *Appl Environ Microbiol* **63**, 2966-2970
- DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMIERUNG (DIN) (1994). DIN32645: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze. Beuth Verlag, Berlin
- DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMIERUNG (DIN) (2002). DIN53804: Statistische Auswertungen. Teil 1: Kontinuierliche Merkmale. Beuth Verlag, Berlin
- DI RAGO JP, COPPEE JY, COLSON AM (1989). Molecular basis for resistance to myxothiazol, mucidin (strobilurin A) and stigmatellin. *J Biol Chem* **264**, 14543-14548
- DOOHAN FM, PARRY DW, NICHOLSON P (1999). *Fusarium* ear blight of wheat: the use of quantitative PCR and visual disease assessment in studies of disease control. *Plant Pathol* **48**, 209-217
- DUNCAN JM, TORRANCE L (1992). Techniques for the rapid detection of plant pathogens. Blackwell Scientific Publications, Oxford
- FARMAN ML (2001). The molecular basis for field resistance to QoI fungicides in *Pyricularia grisea*. *Phytopathology* **91**, 110
- FELSENSTEIN FG (1994). Sensitivity of *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici* to demethylation inhibiting fungicides in Europe. In: Fungicide Resistance, *BCPCC Monograph* **60**, 35-42
- FELSENSTEIN FG (1999). Mehltauerreger in Getreide können sich schnell anpassen. *Ernährungsdienst* **54**, 4
- FISHER CL, PEI GK (1997). Modification of a PCR-based site-directed mutagenesis method. *Biotechniques* **23**, 570-574
- FOSTER SJ, SINGH G, FITT BDL, ASHBY AM (1999). Development of PCR based diagnostic techniques for the two mating types of *Pyrenopezia brassicae* (light leaf spot) on winter oilseed rape (*Brassica napus* spp. *oleifera*). *Physiol Mol Plant Pathol* **55**, 111-119

- FRAAIJE BA, BUTTERS J, COELHO JM, JONES DR, HOLLOMON DW (2002). Following the dynamics of strobilurin resistance in *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* using quantitative allele-specific real-time PCR measurement with the fluorescent dye SYBR GreenI. *Plant Pathol* **51**, 45-54
- FRAAIJE BA, BUTTERS J, HOLLOMON DW (2000). *In planta* genotyping of *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici* isolates for strobilurin-resistance using a flourometric allele-specific PCR assay. In: Proc Brighton Crop Protect Conf - Pests and Diseases, BCPC, Farnham, Surrey, UK, pp401-406
- GEHMANN K, DECAUDIN B, SIEROTZKI H, KUCK KH, MEHL A, WITZENBERGER A, KERZ-MOEHLENDICK F, BEGEL P, LEISSE N, GENET JL, STOERMER K, LORENZ KH, SCHÖFL U (2003). Qol working group of FRAC - Minutes of the meetings. www.frac.info/qoi/qoi_meeting2003.html
- GEIER BM, SCHÄGGER H, BRANDT U, COLSON AM, VON JAGOW G (1992). Point mutation in cytochrome *b* of yeast ubihydroquinone: cytochrome-*c* oxidoreductase causing myxothiazol resistance and facilitated dissociation of the iron-sulfur subunit. *Eur J Biochem* **208**, 375-380
- GERTH K, IRSCHIK H, REICHENBACH H, TROWITZSCH W (1980). Myxothiazol, an antibiotic from *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales). I. Cultivation, isolation, physiochemical and biological properties. *J Antibiot* **33**, 1474-1479
- GISI U (2002). Chemical control of downy mildews. In: Advances in downy mildew research, ed by Spencer Phillips PTN, Gisi U and Lebeda A, Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, pp 119-159
- GISI U, CHIN KM, KNAPOVA G, KÜNG-FÄRBER R, MOHR U, PARISI S, SIEROTZKI H, STEINFELD U (2000). Recent developments in elucidating modes of resistance to phenylamide, DMI and strobilurin fungicides. *Crop Prot* **19**, 863-872
- GODWIN JR, ANTHONY VM, CLOUGH JM, GODFREY CRA (1992). ICIA5504: a novel, broad spectrum, systemic β -methoxyacrylate fungicide. In: Proc Brighton Crop Protect Conf - Pests and Diseases, BCPC, Farnham, Surrey, UK, pp435-442
- GODWIN JR, BARTLETT DW, CLOUGH JM, GODFREY CRA, HARRISON EG, MAUND S (2000). Picoxystrobin: a new Strobilurin fungicide for use on cereals. In: Proc Brighton Crop Protect Conf - Pests and Diseases, BCPC, Farnham, Surrey, UK, pp533-540
- GODWIN JR, BARTLETT DW, HEANEY SP (1999). Azoxystrobin: Implications of biochemical mode of action, pharmacokinetics and resistance management for spray programmes against Septoria diseases of wheat. In: Septoria on cereals: a study of pathosystems, ed by: Lucas JA, Bowyer P, Anderson HM, CABI: Wallingford, UK, pp299-315
- GODWIN JR, YOUNG JE, HART CE (1994). ICIA5504: Effects on development of cereal pathogens. In: Proc Brighton Crop Protect Conf - Pests and Diseases, BCPC, Farnham, Surrey, UK, pp259-264
- GODWIN JR, YOUNG JE, WOODWARD DJ, HART CE (1997). Azoxystrobin: effects on the development of grapevine downy mildew (*Plasmopara viticola*). Proc ANPP Cinquieme Conference Internationale sur les Maladies des Plantes, Tours, pp871-878
- GRAF U, HENNING HJ, STANGE K, WILRICH PT (1987). Formeln und Tabellen der angewandten Statistik. Springer Verlag, Berlin, 3. Auflage
- GRIFFITH AJF (1996). Mitochondrial inheritance in filamentous fungi. *J Genet* **75**, 403-414
- GROSS E, ARNOLD N, GOETTE J, SCHWARZ-BOEGER U, KIECHLE M (1999). A comparison of *BRCA1* mutation analysis by direct sequencing, SSCP and DHPLC. *Hum Genet* **105**, 72-78
- HAMAMOTO H, HASEGAWA K, NAKAUNE R, JIN LEE Y, AKUTSU K, HIBI T (2001a). PCR-based detection of sterol demethylation inhibitor-resistant strains of *Penicillium digitatum*. *Pest Manag Sci* **57**, 839-843
- HAMAMOTO H, NAEATA O, HASEGAWA K, NAKAUNE R, JIN LEE Y, MAKIZUMI Y, AKUTSU K, HIBI T (2001b). The Role of the ABC Transporter Gene *PMR1* in Demethylation Inhibitor Resistance in *Penicillium digitatum*. *Pestic Biochem Physiol* **70**, 19-26
- HARRISON RG, RAND DM, WHEELER WC (1985). Mitochondrial DNA size variation within individual crickets. *Science* **228**, 1446-1448
- HAYASE Y, KATAOKA T, MASUKO M, NIIKAWA M, ICHINARI M, TAKENAKA H, TAKAHASHI T, HAYASHI Y, TAKEDA R (1995). Phenoxyphenyl alkoxyiminoacetamides. New broad-spectrum fungicides. In: Synthesis and Chemistry of Agrochemicals IV, ed by Baker DR, Fenyes JG, Basarab GS, ACS

- Symposium Series No 584, American Chemical Society, Washington DC, USA, Chapter 30, 343-353
- HEANY SP, DAVIES SA, BRADLEY SS, OAKHILL JS (1997). Determination of baseline sensitivities of European populations of *Plasmopara viticola* and *Uncinula necator* to the new strobilurin fungicide, azoxystrobin. Poster at Conference 'Resistance '97 - Integrated Approach to Combating Resistance' at Harpenden, UK
- HEANY SP, HALL AA, DAVIES SA, OLAYA G (2000). Resistance to fungicides in the Qol-STAR cross-resistance group: current perspectives. In: Proc Brighton Crop Protect Conf - Pests and Diseases, BCPC, Farnham, Surrey, UK, pp755-762
- HEANY SP, LORENZ G (1997). Accurate measurement of sensitivity to strobilurin fungicides – in vitro or in vivo? Poster at Conference 'Resistance '97 - Integrated Approach to Combating Resistance' at Harpenden, UK
- HIRATSUKA M, AGATSUMA Y, MIZUGAKI M (1999). Rapid detection of *CYP29*3* alleles by real-time fluorescence PCR based on SYBR Green. *Mol Genet Metab* **68**, 357-362
- HOLLOMON D (1998). Diagnostics in modern disease control strategies. In: Proc Brighton Crop Protect Conf - Pests and Diseases, BCPC, Farnham, Surrey, UK, pp771-777
- HOWELL WM, JOBS M, GYLLENSTEN U, BROOKES V (1999). Dynamic allele-specific hybridization. A new method for scoring single nucleotide polymorphisms. *Nat Biotechnol* **17**, 87-88
- HÜBNER P, WAIBLINGER HU, PIETSCH K, BRODMANN P (2001). Validation of PCR methods for the quantification of genetically modified plants in food. *J AOAC Int* **84**, 1855-1864
- JORDAN DB, LIVINGSTONE RS, BISAHA JJ, DUNCAN KE, PEMBER SO, PICOLLELLI MA, SCHWARTZ RS, STERNBERG JA, TANG XS (1999). Mode of action of famoxadone. *Pestic Sci* **55**, 105-118
- JOSHI MM, STERNBERG JA (1996). DPX-JE874: A broad-spectrum fungicide with a new mode of action. In: Proc Brighton Crop Protect Conf - Pests and Diseases, BCPC, Farnham, Surrey, UK, pp21-26
- JUTSUM AR, HEANEY SP, PERRIN BM, WEGE PJ (1998). Pesticide resistance: assessment of risk and the development and implementation of effective management strategies. *Pestic Sci* **54**, 435-446
- KOENRAADT H, JONES AL (1992). The use of allele-specific oligonucleotide probes to characterize resistance to benomyl in field strains of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **82**, 1354-1358
- KOENRAADT H, SOMMERVILLE SC, JONES AL (1992). Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Phytopathology* **82**, 1348-1354
- KONIECZNY A, AUSUBEL F (1993). A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J* **4**, 403-410
- KUCK KH (2001). FRAC working group, SBI fungicides, 2001. www.frac.info/sbi_wg.html
- KUCK KH, SCHEINPFLUG H, PONTZEN R (1995). Biology of sterol-biosynthesis inhibiting fungicides. In: Modern Selective Fungicides, ed by: Lyr H. Gustav Fischer, Jena 205-258
- KÜNG FÄRBER R, CHIN KM, LEADBITTER N (2002). Sensitivity of *Venturia inaequalis* to trifloxystrobin. *Pest Manag Sci* **58**, 261-267
- KUPPUSWAMY MN, HOFFMANN JW, KASPER CK, SPITZERSG, GROCE SL, BAJAJ SP (1991). Single nucleotide primer extension to detect genetic diseases: experimental application to hemophilia B (*factor IX*) and cystic fibrosis genes. *Proc Natl Acad Sci* **88**, 1143-1147
- KUTYAVIN I, AFONINA I, MILS A, GORN VV, LUKHTANOV EA, BELOUSOV ES, SINGER EJ, WALBURGER DK, LOKHOV SG, GALL AA, DEMPCY R, REED MW, MEYER RB (2000). 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res* **28**, 655-661
- LEE LG, CONNELL CR, BLOCH W (1993). Allelic discrimination by nick translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res* **21**, 3761-3766
- LEE SB, TAYLOR JW (1990). Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: PCR protocols. A guide to methods and applications, ed by: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. Academic Press, San Diego, USA, 282-287

- LEINHOS GME, GOLD RE, DÜGGELIN M, GUGGENHEIM R (1997). Development and morphology of *Ustilago necator* following treatment with the fungicides kresoxim-methyl and penconazole. *Mycol Res* **101**, 1033-1046
- LEROUX P, CHAPELAND F, ARNOLD A, GRETT M (2000). New Cases of Negative Cross-resistance between Fungicides, Including Sterol Biosynthesis Inhibitors. *J Gen Plant Pathol* **66**, 75-81
- LUCAS JA (2001). Detection and diagnosis of plant disease. www.iacr.bbsrc.ac.uk/corporate/annualreport/2000-2001/3%20Detection.pdf
- LUCK JE, GILLINGS MR (1995). Rapid identification of benomyl resistant strains of *Botrytis cinerea* using the polymerase chain reaction. *Mycol Res* **99**, 1483-1488
- LYAMICHEV V, MAST AL, HALL JG, PRUDENT JR, KAISER MW, TAKOVA T, KWIATKOWSKI RW, SANDER TJ, DE ARRUDA M, ARCO DA, NERI BP, BROW MAD (1999) Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes. *Nat Biotechnol* **17**, 292-296
- MARGOT P, HUGGENBERGER F, AMREIN J, WEISS B (1998). CGA 279202: a new broad-spectrum strobilurin fungicide. In: Proc Brighton Crop Protect Conf - Pests and Diseases, BCPC, Farnham, Surrey, UK, pp375-382
- MARTIN LA, FOX RTV, BALDWIN BC, CONNERTON IF (1992). Use of polymerase chain reaction for the diagnosis of MBC resistance in *Botrytis cinerea*. In: Proc Brighton Crop Protect Conf - Pests and Diseases, BCPC, Farnham, Surrey, UK, pp204-214
- MARTIN RR, JAMES D, LEVESQUE CA (2000). Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. *Annu Rev Phytopathol* **38**, 207-239
- MASUKO N, NIIKAWA M, KATAOKA T, ICHINARI M, TAKENAKA H, HAYASE Y, HAYASHI Y, TAKEDA R (1993). Novel antifungal alkoxyiminoacetamide derivatives. Proc Sixth Internat Cong Plant Pathol: Montreal, Canada, ICPP, abstract no 3.7.16,91
- MCDUGALL P (2001). Crop protection and agricultural biotechnology consultants, Report 249, July 2001
- MCKAY GJ, EGAN D, MORRIS E, BROWN AE (1998): Identification of benzimidazole resistance in *Cladobotryum dendroides* using a PCR-based method. *Mycol Res* **102**, 671-676
- MENAB AA (1999). Control of tomato late blight and early blight with fungicides, 1999. *Fungic Nematic Rept* **55**, 277
- MERCER RT, LACROIX G, GOUOT JM, LATOROSE MP (1998). RPA 407213: A novel fungicide for the control of downy mildews, late blight and other diseases on a range of crops. In: Proc Brighton Crop Protect Conf - Pests and Diseases, BCPC, Farnham, Surrey, UK, pp319-326
- MOHLER V, HSAM SLK, ZELLER FJ, WENZEL G (2001). An STS marker distinguishing the rye-derived powdery mildew resistance alleles at the *Pm8/Pm17* locus of wheat. *Plant Breed* **120**, 448-450
- MOHLER V, JAHOR A (1996). Allele-specific amplification of polymorphic sites for the detection of powdery mildew resistance loci in cereals. *Theor Appl Genet* **93**, 1078-1082
- NEWTON CR, GRAHAM A, HEPTINSTALL LE, POWELL SJ, SUMMERS C, KALSHEKER N, SMITH JC, MARKHAM AF (1989). Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* **17**, 2503-16
- NICHOLSON P, REZANOOR HN, SIMPSON DR, JOYCE D (1997). Differentiation and quantification of the cereal eyespot fungi *Tapesia yallundae* and *Tapesia acuformis* using a PCR assay. *Plant Pathol* **46**, 842-856
- NILSSON M, KREJCI K, KOCH J, KWIATKOWSKI M, GUSTAVSSON P, LANDEGREN U (1997). Padlock probes reveal single-nucleotide differences, parent of origin and *in situ* distribution of centromeric sequences in human chromosomes 13 and 21. *Nat Genet* **16**, 252-255
- OEFNER PJ, UNDERHILL PA (1995). Comparative DNA sequencing by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). *Am J Hum Genet* **57**, 1547
- OEFNER PJ, UNDERHILL PA (1998). DNA mutation detection using denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). In: Current protocols in human genetics (Suppl 19), ed by: Dracopoli

- NC, Haines JL, Korf BR, Moir DT, Morton CC, Seidman CE. Wiley & Son, New York, 7.10.1-7.10.12
- OLAYA G, KÖLLER W (1999). Baseline sensitivities of *Venturia inaequalis* populations to the strobilurin fungicide kresoxim-methyl. *Pestic Sci* **54**, 230-236
- OLAYA G, ZHENG D, KÖLLER W (1998). Differential responses of germinating *Venturia inaequalis* conidia to kresoxim-methyl. *Plant Dis* **83**, 274-278
- ORITA M, IWAHANA H, KANAZAWA H, HAYASHI K, SEKIYA T (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci* **86**, 2766-2770
- PARIS M, JONES MGK, EGLINTON JK (2002). Genotyping single nucleotide polymorphisms for selection of barley beta-amylase alleles. *Plant Mol Biol Rep* **20**, 149-159
- PARK RF, JAHOOOR A, FELSENSTEIN FG (2000). Population structure of *Puccinia recondita* in Western Europe during 1995, as assessed by variability in pathogenicity and molecular markers. *J Phytopathol* **148**, 169-179
- RASMUSSEN R (2001). Quantification on the LightCycler. In: Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications, ed by: Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K., Springer Press, Heidelberg, 21-34.
- REUVINI M (2001). Activity of trifloxystrobin against powdery and downy mildew diseases of grapevines. *Canad J Plant Pathol* **23**, 52-59
- ROBINSON HL, RIDOUT CJ, SIEROTZKI H, GISI U, BROWN JKM (2002). Isogamous, hermaphroditic inheritance of mitochondrion-encoded resistance to Qo inhibitor fungicides in *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*. *Fungal Genet Biol* **36**, 98-106
- ROHEL EA, LAURENT P, FRAAIJE BA, CAVELIER N, HOLLOMON DW (2002). Quantitative PCR monitoring of the effect of azoxystrobin treatments on *Mycosphaerella graminicola* epidemics in the field. *Pest Manag Sci* **58**, 248-254
- RÖHR H, KÜES U, STAHL U (1999). Organelle DNA of plants and fungi: inheritance and recombination. *Prog Bot* **60**, 39
- ROSS P, HALL L, SMIRNOV I, HAFF L (1998). High level multiplex genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry. *Nat Biotechnol* **16**, 1347-1351
- SAGHAI-MAROOF MA, SOLIMAN KM, JORGENSEN RA, ALLARD RW (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci* **81**, 8014-8018
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T (1989). Molecular Cloning: A laboratory manual, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* **74**, 5463-5467
- SAUTER H, STEGLICH W, ANKE T (1999). Strobilurins: evolution of a new class of active substances. *Angew Chem Int* **38**, 1328-1349
- SCHNABEL G, JONES AL (2001). The 14 α -demethylase (*CYP51A1*) gene is overexpressed in *Venturia inaequalis* strains resistant to myclobutanil. *Phytopathology* **91**, 102-110
- SCHNEEBERGER C, SPEISER P, KURY F, ZEILINGER R (1995). Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *PCR Meth Appl* **4**, 234-238
- SCHOTS A, DEWEY FM, OLIVER R (2000). Modern assays for plant pathogenic fungi: Identification, detection and quantification, CAB International, Wallingford, UK
- SCHWARZ G, BÄUMLER S, BLOCK A, FELSENSTEIN FG, WENZEL G (2004). Determination of detection and quantification limits for SNP allele frequency estimation in DNA pools using real time PCR. *Nucleic Acids Res* **32**, e24
- SCHWARZBACH E (1979). A high throughput jet trap for collecting mildew spores on living leaves. *Phytopath Z* **94**, 165-171

- SHUMAKER JM, METSPALU A, CASKEY CT (1996). Mutation detection by solid-phase primer extension. *Hum Mutat* **7**, 346-354
- SIEGFRIED W, HOLLINGER E (1998). Strobilurine im Weinbau - neue Versuchsergebnisse zur Bekämpfung des Echten und Falschen Mehltaus. *Schweis Z Obst-Weinbau* **4**, 102-104
- SIEROTZKI H, GISI U (2002): Molecular Diagnostics for Fungicide Resistance in Plant Pathogens. In: Chemistry of Crop Protection, ed by Voss G, Ramos G, John Wiley & Sons pp71-88
- SIEROTZKI H, PARISI S, STEINFELD U, TENZER I, POIREY S, GISI U (2000b). Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc1 complex of *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest Manag Sci* **56**, 833-841
- SIEROTZKI H, SCHLENZIG A, WULLSCHLEGER J, WINDASS J, STANGER C, BURBIDGE J, CLEERE S, HALL A, GISI U (2002). Cytochrome *b* gene in fungi: phylogenetic relationships and a mutation for QoI resistance. In: Modern fungicides and antifungal compounds III, ed by Lyr H, Russel PE, Dehne H-W, Gisi U and Kuck KH, 13th International Reinhardsbrunn Symposium, Thuringia Germany, AgroConcept, Bonn
- SIEROTZKI H, WULLSCHLEGER J, GISI U (2000a). Point-Mutation in cytochrome *b* gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici* field isolates. *Pestic Biochem Physiol* **68**, 107-112
- SOKOLOV BP (1990). Primer extension technique for the detection of single nucleotide in genomic DNA. *Nucleic Acids Res* **18**, 3671
- SOLIGNAC M, MONNEROT M, MOUNDOU JC (1983). Mitochondrial DNA heteroplasmy in *Drosophila mauritiana*. *Proc Natl Acad Sci* **80**, 6942-6946
- SPECHT CA, NOVOTNY CP, ULLRUCH RC (1992). Mitochondrial DNA of *Schizophyllum commune*: restriction map, genetic map and mode of inheritance. *Curr Genet* **22**, 129-134
- SPIEGELMAN JI, MINDRINOS MN, OEFNER PJ (2000). High-accuracy DNA sequence variation screening by DHPLC. *Biotechniques* **29**, 1084-1092
- STEINFELD U, SIEROTZKI H, PARISI S, GISI U (2002). Comparison of resistance mechanisms to strobilurin fungicides in *Venturia inaequalis*. In: Modern fungicides and antifungal compounds III, ed by Lyr H, Russel PE, Dehne H-W, Gisi U and Kuck KH, 13th International Reinhardsbrunn Symposium, Thuringia Germany, AgroConcept, Bonn
- STERNBERG JA, GEFFKEN D, ADAMS JB JR, PÖSTAGES R, STERNBERG CG, CAMPBELL CL, MOBERG WK (2001). Famoxadone: the discovery and optimisation of a new agricultural fungicide. *Pest Manag Sci* **57**, 143-152
- TAKANO H (2000). Intimate relationship between mtDNA, plasmids and the fusion of mitochondria. *J Plant Res* **113**, 223-229
- TANKSLEY SD (1983). Molecular Markers in plant breeding. *Plant Mol Biol Rep* **1**, 3-8
- TÄPP I, MALMBERG E, RENNEL E WIK M, SYVÄNEN A-C (2000). Homogenous scoring of single-nucleotide polymorphisms: comparison of the 5'-nuclease assay and molecular beacon probes. *Biotechniques* **4**, 732-738
- THELWELL N, MILLINGTON S, SOLINAS A, BOOTH J, BROWN T (2000). Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res* **28**, 3752-3761
- THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ (1994). CLUSTAL W, Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680
- UGOZZOLI L, WALLACE RB (1991). Allele-specific polymerase chain reaction. *Methods Enzymol* **2**, 42-48
- VANDEN BOSSCHE H, IBROAM R (1997). Mechanisms of antifungal resistance. *Micol* **14**, 44-49
- VON JAGOW G, GRIBBLE GW, TRUMPOWER BL (1986). Mucidin and strobilurin A are identical and inhibit electron transfer in the cytochrome *bc1* complex of the mitochondrial respiratory chain at the same site as myxothiazol. *Biochemistry* **25**, 775-780

- VONDRÁČEK M, ČAPKOVÁ J, ŠLECHTA J, BENDA A, MUSILEK V, CUDLIN J (1967). Isolation of a new anti-fungal antibiotic, Czech Patent Application. CS 136 495; *Chem Abstr* **75**, 4,02
- WANG DG, FAN J-B, SIAO C-J, BERNO A, YOUNG P, SAPOLSKY R, GHANDOUR G, PERKINS N, WINCHESTER E, SPENCER J, KRUGLYAK L, STEIN L, HSIE L, TOPALOGLOU T, HUBBELL E, ROBINSON E, MITTMANN M, MORRIS MS, SHEN N, KILBURN D, RIOUX J, NUSBAUM C, ROZEN S, HUDSON TJ, LIPSHUTZ R, CHEE M, LANDER ES (1998). Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* **280**, 1077-1082
- WARD E (1994). Use of the Polymerase Chain Reaction for identifying plant pathogens. In: Ecology of plant pathogens, ed by: Blakeman JP and Williamson B. CAB International, Wallingford, UK, 143-160
- WARD E (1995). Improved polymerase chain reaction (PCR) detection of *Gaeumannomyces graminis* including a safeguard against false negatives. *Eur J Plant Pathol* **101**, 561-566
- WARD E, ADAMS MJ (1998). Analysis of ribosomal DNA sequences of *Polymyxa* species and related fungi and the development of genus- and species-specific PCR primers. *Mycol Res* **102**, 965-974
- WHEELER IE, KENDALL SJ, BUTTERS J, HOLLOMON DW, HALL L (1995). Using allele-specific oligonucleotide probes to characterize benzimidazole resistance in *Rhynchosporium secalis*. *Pestic Sci* **43**, 201-209
- WHITE TC (1997). Increased mRNA levels of *ERG16*, *CDR*, and *MDR1* correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 1482-1487
- WILLE P, SIEROTZKI H, STANGER C, CLEERE S, BURBIDGE J, HALL A, WINDASS J, GISI U (2002). Qualitative and quantitative identification of SNPs in Plant Pathogens. In: Modern fungicides and antifungal compounds III, ed by Lyr H, Russel PE, Dehne H-W, Gisi U and Kuck KH, 13th International Reinhardsbrunn Symposium, Thuringia Germany, AgroConcept, Bonn
- WILLE P, SIEROTZKI H, TENZER I, GISI U (2000). Molecular tools to diagnose strobilurin resistance in *Mycosphaerella fijiensis*, Annales 6th Intern Conf Plant Dis, ANPP, Tours, France, pp843-850
- YOUNG DH, SPIEWAK SL, SLAWECKI RA (2001). Laboratory studies to assess the risk of development of resistance to zoxamide. *Pest Manag Sci* **57**, 1081-1087
- ZHENG D, KÖLLER W (1997). Characterization of the mitochondrial cytochrome *b* gene from *Venturia inaequalis*. *Curr Genet* **32**, 361-366
- ZWIERS LH, DE WAARD MA (2000). Characterization of the ABC Transporter Genes *MgAtr1* and *MgAtr2* from the Wheat Pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genet Biol* **30**, 115-125

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. G. Wenzel für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und für die Möglichkeit, diese Arbeit am Lehrstuhl unter ausgezeichneten Bedingungen durchführen zu können, danken.

Herrn Professor Dr. W. Oßwald danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Dr. F.G. Felsenstein danke ich für seine stete Diskussionsbereitschaft, für die freundliche Aufnahme in die Laborräume der EpiLogic und der EpiGene GmbH und für die Mitfinanzierung dieses Forschungsprojekts.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Herrn Dr. G. Schwarz für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung dieses Projekts, für die ermutigenden fachlichen Diskussionen, für die kritische Durchsicht des Manuskripts und weil er mir gezeigt hat, was Pragmatismus bedeutet.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe 'Molekulare Marker' am Lehrstuhl für Pflanzenbau und -züchtung danke ich für die offene und freundliche Arbeitsatmosphäre. Vor allem Herrn Dr. V. Mohler, Herrn M. Dilger sowie Frau A. Block und Herrn T. Funk danke ich für die lebhaften fachlichen Diskussionen.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der EpiLogic und der EpiGene GmbH danke ich für die großartige Unterstützung meines Projektes in Rat und Tat. Dies gilt insbesondere für Frau S. Hasyn und Herrn B. Jaser, die mir bei der Etablierung und Durchführung der *'in vivo'*-Biotests eine große Hilfe waren.

Meinen Eltern danke ich, dass sie mir diese lange Ausbildung ermöglicht haben.

Besonders möchte ich mich bei meiner Frau Magdalena bedanken, die mir zu jeder Zeit den Rücken frei gehalten hat, damit ich mich voll auf dieses Projekt konzentrieren konnte.

Diese Arbeit wurde finanziert von der EpiGene GmbH und der Bayrischen Forschungstiftung.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Stefan Bäumlér

Geburtsdatum: 29.11.1973

Geburtsort: Neustadt a.d. Donau

Familienstand: Verheiratet mit Magdalena Bäumlér, geb. Opielka
Zwei Kinder

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung

1980 - 1984 Grundschnule Abensberg

1984 - 1993 Donau Gymnasium Kelheim
Allgemeine Hochschulreife

anschließend

1993 - 1994 Grundwehrdienst

Akademische Ausbildung

11/94 - 09/00 Studium der Agrarwissenschaften
Technische Universität München – Weihenstephan
Studienrichtung: 'Pflanzenbauwissenschaften'

09/00 Abschluss als Diplom-Agraringenieur (univ.)

Berufstätigkeit

11/00 - 04/03 Wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl für
Pflanzenbau und -züchtung der TU-München-
Weihenstephan