

**Molekularsystematische Untersuchungen an  
Vertretern der pflanzenparasitischen Gattung  
*Exobasidium* (Basidiomycota)**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

an der Fakultät für Biologie/ Chemie/ Geowissenschaften  
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Diplom-Biologin

**Heidi Döring**

aus Kassel

**Bayreuth 2003**

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Pflanzensystematik der Universität Bayreuth unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. P. BLANZ (jetzt: Karl-Franzens-Universität Graz) angefertigt. Die dieser Arbeit zugrunde liegenden praktischen Laborarbeiten wurden im Zeitraum von Juli 1992 bis Januar 1995 sowie von März bis August 1997 durchgeführt.

Teile der Arbeit wurden durch ein Stipendium und Forschungsgelder des Graduiertenkollegs „Pflanzen-Herbivoren-Systeme“ der Universität Bayreuth gefördert.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Tag der Abgabe: 18.12.2003

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 07.05.2004

Mitglieder des Prüfungsausschusses:

- Herr Prof. Dr. P. BLANZ (Gutachter)
- Herr Prof. Dr. G. KRAUSS (Vorsitzender)
- Frau Prof. Dr. S. LIEDE-SCHUMANN
- Herr Prof. Dr. G. RAMBOLD (Gutachter)
- Herr Prof. Dr. W. SCHUMANN

### **Teilergebnisse dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht:**

- BLANZ, P. & H. DÖRING (1995) Taxonomic relationships in the genus *Exobasidium* (Basidiomycetes) based on ribosomal DNA analysis. *Studies in Mycology* **38**: 119-127.
- DÖRING, H. & P. BLANZ (2000) 18S rDNA-Analysen bei der Gattung *Exobasidium*. *Hoppea* **61**: 85-100.

### **Teilergebnisse dieser Arbeit wurden auf Tagungen vorgestellt:**

#### **Vorträge**

- DÖRING, H. „RFLP-Analysen bei Arten der Gattung *Exobasidium*“- IV. Tagung der Gesellschaft für Mykologie und Lichenologie, 16.-18.3.1994, Braunschweig.
- DÖRING, H., R. BRANDL & P. BLANZ „Host specificity in the parasite / host system *Exobasidium* (Basidiomycetes) and Ericaceae as based on molecular data“ - 7<sup>th</sup> International Congress of Mycology Division, International Union of Microbiological Societies Congresses, 3.-8.7.1994, Prag.
- BLANZ, P. & H. DÖRING „Ribosomal RNA analysis as a tool to characterize taxonomic relationships in the genus *Exobasidium* (Basidiomycetes)“ - 5<sup>th</sup> International Mycological Congress, 14.-21.8.1994, Vancouver.

#### **Poster**

- DÖRING, H. & P. BLANZ „RFLP-Analysen in der Gattung *Exobasidium* (Basidiomycetes): PCR-Fingerprinting“ - Tagung „Molekularbiologie der Pilze“, Institut für Genbiologische Forschung Berlin GmbH, 7.-10.10.1993, Berlin.
- DÖRING, H. „PCR-Fingerprinting zur Charakterisierung von Stämmen in der Gattung *Exobasidium*“ - IV. Tagung der Gesellschaft für Mykologie und Lichenologie, 16.-18.3.1994, Braunschweig.
- BLANZ, P. & H. DÖRING „Molekulare Taxonomie mittels DNA-Untersuchungen am Beispiel der pflanzenpathogenen Pilzgattung *Exobasidium*“ - Gemeinsame Jahrestagung der Österreichischen Biochemischen Gesellschaft und der Österreichischen Gesellschaft für Genetik und Gentechnik, 21.-23.9.1994, Salzburg.
- DÖRING, H. & P. BLANZ „Introns in der 26S rDNA von Stämmen der Gattung *Exobasidium* (Basidiomycetes)“ - Botanikertagung, Deutsche Botanische Gesellschaft und Vereinigung für Angewandte Botanik, 25.-31.8.1996, Düsseldorf.
- DÖRING, H. & P. BLANZ „DNA sequence comparison of internal transcribed spacers in rDNA tandem repeats in the parasitic fungal genus *Exobasidium*“ - Gemeinsame Jahrestagung der Österreichischen Biochemischen Gesellschaft und der Österreichischen Gesellschaft für Genetik und Gentechnik, 17.-19.9.1997, Wien.
- STEVANECZ, E., H. DÖRING, B. SPREITZER & P. BLANZ „Gruppe-I-Introns im 26S rRNA-Gen von *Exobasidium* (Basidiomycetes)“ - Tagung der Gesellschaft für Mykologie und Lichenologie, 24.-26.10.1997, Regensburg.

### **Accession Numbers publizierter DNA-Sequenzdaten (EMBL-Datenbank):**

18S rDNA: AJ271380, AJ271381, AJ271382



# Inhaltsverzeichnis

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Molekulare Marker in der Systematik und Evolutionsforschung der Pilze .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Die Gattung <i>Exobasidium</i> Woronin.....</b>	<b>13</b>
<b>1.3 Zielsetzung und Gliederung der Arbeit.....</b>	<b>22</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Untersuchte Stämme.....</b>	<b>24</b>
<b>2.2 Molekulare Methoden .....</b>	<b>29</b>
2.2.1 Anzucht der Kulturen.....	29
2.2.2 Isolierung von genomischer DNA.....	30
2.2.3 Amplifikation von rDNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion.....	32
2.2.3.1 Verwendete PCR-Primer .....	32
2.2.3.2 PCR-Ansätze und PCR-Profile .....	34
2.2.3.3 Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte und genomischer DNAs.....	36
2.2.4 Spaltung von 26S rDNA PCR-Produkten mit Restriktionsendonukleasen .....	37
2.2.4.1 Aufreinigung der PCR-Produkte.....	38
2.2.4.2 Restriktion der PCR-Produkte.....	38
2.2.4.3 Elektrophoretische Auftrennung der Fragmente in hochauflösender Agarose..	39
.....	39
2.2.5 Direkte Sequenzierung von PCR-Produkten.....	40
2.2.5.1 Verwendete Sequenzierprimer .....	41
2.2.5.2 Manuelle DNA-Einzelstrangsequenzierung mit <sup>35</sup> S-Markierung.....	42
2.2.5.3 Cycle-Sequencing und automatische Sequenzierung am ALFexpress.....	45
2.2.5.4 Cycle-Sequencing und automatische Sequenzierung am Kapillarsequenzierer	46
ABI 310 .....	46
<b>2.3 Datenauswertung.....</b>	<b>48</b>
2.3.1 Auswertung der Agarosegele.....	48
2.3.1.1 Dokumentation der Bilder von Agarosegelen mit CAM .....	48
2.3.1.2 Bildbearbeitung in CAM: Geometrische Korrektur .....	49
2.3.1.3 Bildbearbeitung in CAM: Kontrastierung und Bandenerkennung .....	49
2.3.1.4 kb-Bestimmung in CAM.....	50
2.3.1.5 Densitometrische Analyse in CAM.....	52
2.3.2 Bestimmung der PCR-RFLP-Muster und Erstellung einer binären Matrix.....	53
2.3.3 Sequenzanalysen.....	54
2.3.3.1 Gewinnung und Korrektur der Rohdaten.....	54

2.3.3.2 Datenbankvergleiche.....	55
2.3.3.3 Paarweise Sequenzvergleiche.....	55
2.3.3.4 Alignments .....	55
2.3.4 Dendrogramme und phylogenetische Analysen.....	56
2.3.4.1 Grundlagen und Hintergründe der verwendeten Verfahren .....	56
2.3.4.2 Ähnlichkeitsberechnung für die 0/1-Matrizen der RFLP-Analyse.....	62
2.3.4.3 Phylogenetische Analyse von Sequenzdaten.....	63
2.3.4.3.1 Vergleich der Domäne I der 26S rDNA innerhalb der Gattung <i>Exobasidium</i> .....	64
2.3.4.3.2 Analyse der Sequenzen der Domäne I der 26S rDNA im Kontext der Ustilaginomycetes.....	65
2.3.4.3.3 Phylogenetische Analyse der 18S rDNA-Sequenzdaten .....	67
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>69</b>
<b>3.1 Gruppierung der Stämme nach PCR-RFLP-Daten des 5'-Bereichs der 26S rDNA .....</b>	<b>69</b>
3.1.1 DNA-Isolierung und PCR-Erfolg .....	69
3.1.2 PCR-Produktgrößen des 5'-Bereichs der 26S rDNA .....	70
3.1.3 PCR-RFLP-Analysen des 5'-Bereichs der 26S rDNA .....	75
3.1.3.1 Charakterisierung der Restriktionsfragmente und -muster .....	75
3.1.3.1.1 Zur Genauigkeit der Fragmentgrößenbestimmung in der VisiGel-Matrix .....	75
3.1.3.1.2 Nachweis von Mehrfachbanden über 1D-Analyse.....	78
3.1.3.1.3 Berechnungen der Summen der Restriktionsfragmentlängen der Hydrolysen.....	81
3.1.3.2 Gruppierung der Stämme nach übereinstimmenden RFLP-Mustern .....	82
3.1.3.2.1 Die sechs Restriktionsenzyme differenzieren 20 RFLP-Gruppen.....	82
3.1.3.2.2 Die Restriktionsenzyme differenzieren und gruppieren unterschiedlich .....	84
3.1.3.3 Die 0/1-Matrix der RFLP-Muster und die Homologisierung von Restriktionsfragmenten zwischen unterschiedlichen RFLP-Mustern.....	86
3.1.3.4 Ähnlichkeitsanalyse der RFLP-Muster.....	94
<b>3.2 Gruppierung ausgewählter Stämme nach Sequenzdaten der Domäne I der 26S rDNA .....</b>	<b>100</b>
3.2.1 Alignment und Vergleich der Sequenzen der Domäne I der 26S rDNA innerhalb der Gattung <i>Exobasidium</i> .....	100
3.2.2 Phylogenetische Analyse der Sequenzen der Domäne I der 26S rDNA innerhalb der Gattung <i>Exobasidium</i> .....	103
<b>3.3 Introns in der 26S rDNA als Ursache der unterschiedlichen PCR-Produktgrößen.....</b>	<b>112</b>
<b>3.4 Phylogenie der <i>Exobasidium</i>-Stämme im Kontext der Ustilaginomycetes aufgrund der Sequenzen der Domäne I der 26S rDNA.....</b>	<b>114</b>
<b>3.5 Sequenzvergleich der 18S rDNA ausgewählter Stämme im Kontext der Basidiomycota .....</b>	<b>122</b>
3.5.1 Größenunterschiede der PCR-Produkte zeigen Insertionen in der 18S rDNA an. ....	122

3.5.2	18S rDNA-Sequenzen ausgewählter Stämme .....	124
3.5.3	Phylogenetische Analyse von 18S rDNA-Daten.....	124
<b>3.6</b>	<b>Charakterisierung der ITS-Region ausgewählter Stämme.....</b>	<b>128</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>136</b>
<b>4.1</b>	<b>Mit <i>Exobasidium</i>-Infektionen assoziierte anamorphe Pilze.....</b>	<b>136</b>
<b>4.2</b>	<b>Introns in der 26S rDNA der Gattung <i>Exobasidium</i>.....</b>	<b>149</b>
<b>4.3</b>	<b>Die Gattung <i>Exobasidium</i> - zum Artkonzept.....</b>	<b>158</b>
4.3.1	Zu <i>Exobasidium</i> spp. auf <i>Vaccinium</i> -Wirten .....	161
4.3.2	Zu <i>Exobasidium</i> spp. auf <i>Rhododendron</i> -Wirten (inklusive <i>Azalea indica</i> und <i>Menziesia ferruginea</i> ).....	167
4.3.3	Molekulare Marker und die Charakterisierung von <i>Exobasidium</i> -Arten .....	173
<b>4.4</b>	<b>Zur Phylogenie exobasidialer Pilze und zur Frage der Koevolution mit ihren Wirtspflanzen .....</b>	<b>177</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>195</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>198</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>201</b>
<b>7.1</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>201</b>
<b>7.2</b>	<b>Zitierte Internet-Seiten.....</b>	<b>228</b>

## ANHANG

rRNA/rDNA-Sequenzen von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	I
Sekundärstrukturmodell der 26S rRNA von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	II
GC-Werte von <i>Exobasidium</i> -Stämmen nach BLANZ & OBERWINKLER (1983).....	III
DNA-DNA-Homologien von <i>Exobasidium</i> -Stämmen nach BLANZ (1986) und BLANZ & DÖRING (1995) .....	IV
Mit CAM 2.0 bestimmte Größen der 26S rDNA PCR-Produkte (LR0R/LR9) .....	V
Mit CAM 2.0 nachbestimmte Größen von Fragmenten der DNA-Größenstandards in PCR-Agarosegelen.....	VI
Mit CAM 2.0 nachbestimmte Größen von Fragmenten des DNA-Größenstandards in PCR-RFLP-Gelen (VisiGel-Matrix).....	VII
Vergleich der mit CAM 2.0 bestimmten Größen der Fragmente zweier interner Standards in PCR-RFLP-Gelen.....	VIII
Mit CAM 2.0 bestimmte Größen ausgewählter Restriktionsfragmente unter unterschiedlichen Eichkurven .....	IX
Mit CAM 2.0 bestimmte Größen aller Fragmente zweier interner Standards .....	X
Distanzmatrix der RFLP-Daten.....	XI

UPGMA-Dendrogramme der RFLP-Daten mit „Enzym-Jackknifing“.....	XII
Alignment der Domäne I der 26S rDNA der untersuchten Stämme mit <i>Exobasidium</i> -Referenzsequenzen aus GENBANK .....	XIII
Alignment der Domäne I der 26S rDNA der Ustilaginomycetes.....	XIV
Alignment von Sequenzen der 18S rDNA.....	XV
Sequenzen der ITS-Region ausgewählter Stämme.....	XVI

## **Danksagung**

## **Wissenschaftlicher Lebenslauf**

## **Erklärung**



## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AP-PCR	arbitrarily primed PCR
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
CI	Consistency-Index
CIA	Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch 24:1
CTAB	N'-Hexadecyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid
cm	Zentimeter
DNA	Deoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytidintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	double stranded DNA = Doppelstrang-DNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetic acid
EDTANa <sub>2</sub>	Ethylendiamintetraacetat-Dinatrium-Salz
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ETS	externer transkribierter Spacer des ribosomalen Genclusters
GC-Wert	molarer Anteil von Guanin + Cytosin an der DNA (in %)
g	Gramm
HCl	Salzsäure
Herb.	Herbarium
HI	Homoplasy-Index
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography = Hochdruckflüssigkeitschromatographie
H <sub>2</sub> O	Wasser, hier: autoklaviertes Aqua bidest.
h	Stunde
IGS	intergenischer Spacer des ribosomalen Genclusters
IPNI	The International Plant Names Index
ITS	interner transkribierter Spacer des ribosomalen Genclusters
ITS-Region	Region der internen transkribierten Spacer des ribosomalen Genclusters: ITS 1 - 5.8S rDNA - ITS 2
ITS 1	der interne transkribierte Spacer 1 des ribosomalen Genclusters zwischen der 18S und der 5.8S rDNA <auch Name eines Primers>
ITS 2	der interne transkribierte Spacer 2 des ribosomalen Genclusters zwischen der 5.8S und der 26S rDNA <auch Name eines Primers>
KCl	Kaliumchlorid
kb	Kilobasen
LSU	large subunit = große Untereinheit
l	Liter

M	molar
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MYP	Malz-Hefeextrakt-Pepton-Medium
mA	Milliampere
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mtDNA	mitochondriale DNA
μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μmol	Mikromol
μM	mikromolar
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NTS	nicht-transkribierter Spacer des ribosomalen Genclusters
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD <sub>260</sub>	Optische Dichte gemessen bei 260 nm
PCR	Polymerase Chain Reaction = Polymerasekettenreaktion
PCR-RFLP	RFLP-Analyse von PCR-Produkten
PEG	Polyethylenglykol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
pH	xxx
pmol	Picomol
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RC	rescaled Consistency-Index
RDP	Ribosomal Database Project
Repel-Silan	Dichlordimethylsilan
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism = Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RG	Reaktionsgefäß(e)
RI	Retention-Index
RNA	Ribonucleic acid = Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
rDNA	ribosomale DNA
rpm	rotations per minute = Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
r-Wert	kophenetischer Korrelationswert
S	Svedberg-Einheiten
SDS	Sodiumdodecylsulfat = Natriumdodecylsulfat
SSU	small subunit = kleine Untereinheit
s	Sekunde
s.str.	sensu stricto = im engeren Sinn
sp.	species = Art: eine bestimmte, aber nicht näher spezifizierte Art
spec.	species = Art: eine nicht näher bestimmte Art (= unbestimmt)
spp.	species = Arten: bestimmte, aber nicht näher spezifizierte Arten (Plural)
ssDNA	single stranded DNA = Einzelstrang-DNA
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer

TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxy)-1,3-propandiol = Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit <bei Enzymmengen-Angaben>
UPGMA	unweighted pair-group method using arithmetic averages
UV	ultraviolett
V	Volt
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
Vol.	Volumen bzw. Volumina
var.	Varietät
v/v	volume per volume = Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	weight per volume = Gewicht pro Volumen
18S rDNA	der für die 18S rRNA kodierende DNA-Abschnitt = SSU rDNA
26S rDNA	der für die 26S rRNA kodierende DNA-Abschnitt = LSU rDNA
5.8S rDNA	der für die 5.8S rRNA kodierende DNA-Abschnitt
[ $\alpha$ - <sup>35</sup> S]-dATP	<sup>35</sup> S-markiertes dATP
°C	Grad Celsius

Nukleotide und Ambiguous Code nach Festlegung des NOMENCLATURE COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY (1985)

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
K	G/T
M	A/C
R	A/G
S	C/G
W	A/T
Y	C/T
N	A/C/G/T

Wissenschaftliche Gattungs- und Artnamen, Stammbezeichnungen

Häufig verwendete Gattungsnamen werden wie folgt abgekürzt:

<i>And.</i>	<i>Andromeda</i>
<i>E.</i>	<i>Exobasidium</i>
<i>Menz.</i>	<i>Menziesia</i>
<i>Rh.</i>	<i>Rhododendron</i>
<i>V.</i>	<i>Vaccinium</i>

Die Stammnummern der bearbeiteten *Exobasidium*-Stämme sind in Kapitel 2.1 aufgeführt.

Bei der ersten Erwähnung von Arten und Gattungen im Text sind immer die Autoren genannt. Für die untersuchten Exobasidien und ihre Wirte sind diese in Kapitel 2.1 nochmals zusammengefaßt. Die Abkürzungen der Autoren richten sich nach BRUMMITT & POWELL (1992, online unter '[http://www.ipni.org/ipni/query\\_author.html](http://www.ipni.org/ipni/query_author.html)' THE INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX - AUTHOR QUERY). Die Autoren sind, soweit nicht anders vermerkt, bei pilzlichen Taxa nach den CABI BIOSCIENCE-Datenbanken angegeben ('<http://194.131.255.3/cabipages/Names/fundic.asp>' CLASSIFICATION FROM THE 9<sup>TH</sup> EDITION OF THE DICTIONARY OF FUNGI, '<http://194.131.255.3/cabipages/Names/Names.asp>' DATABASE OF FUNGAL NAMES: INDEXFUNGORUM, FUNINDEX) und bei pflanzlichen Taxa nach den Angaben des INDEX KEWENSIS (IK) im IPNI ('[http://www.ipni.org/ipni/query\\_ipni.html](http://www.ipni.org/ipni/query_ipni.html)' THE INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX QUERY).



# 1 Einleitung

## **1.1 Molekulare Marker in der Systematik und Evolutionsforschung der Pilze**

Zur Klärung systematischer Fragestellungen und phylogenetischer Zusammenhänge werden heute unterschiedliche molekulare Merkmale genutzt, die unabhängig von „klassischen“ Datensätzen wie beispielsweise morphologischen oder auch ultrastrukturellen Merkmalen erhoben werden können. Schon 1965 wurde postuliert, daß genetische Information tragende oder ausdrückende Makromoleküle wie Nukleinsäuren und Proteine evolutiv-historische Zusammenhänge widerspiegeln können (ZUCKERKANDL & PAULING). Damit können sie als „Marker“ für Verwandtschaftsanalysen dienen, was durch die Berechnung erster „molekularer Stammbäume“ aufgrund von Aminosäuresequenzen anhand von Proteinen wie dem Cytochrom c (FITCH & MARGOLIASH 1967, JUKES & CANTOR 1969, DAYHOFF *et al.* 1972, FITCH 1976) eindrucksvoll bestätigt wurde.

### **Chemotaxonomie, GC-Werte und DNA-DNA-Homologien**

Gerade in der Systematik der Pilze, wo häufig - wie beispielsweise bei den Hefen - nicht genügend aussagekräftige morphologische Merkmale zur Verfügung stehen, wurden und werden vielfältig neben physiologischen Tests auch chemotaxonomische Merkmale verwendet. So wurden beispielsweise die auftretenden unterschiedlichen Typen des Ubichinons Coenzym Q (YAMADA & KONDO 1973, YAMADA *et al.* 1983, KURAISHI *et al.* 1985, YAMADA *et al.* 1987, SUGIYAMA *et al.* 1988) und die Zuckerszusammensetzung der Zellwände (BARTNICKI-GARCIA 1968, 1970, DÖRFLER 1990, PRILLINGER *et al.* 1990a) bzw. auch die Kohlenhydratzusammensetzung ganzer Zellen (WEIJMAN & DE HOOG 1975, VON ARX & WEIJMAN 1979, WEIJMAN & RODRIGUES DE MIRANDA 1983, SUGIYAMA *et al.* 1985, WEIJMAN & GOLUBEV 1987) erfolgreich als Marker zur Charakterisierung von Verwandtschaftsgruppen eingeführt. Schon früh wurden aber auch auf Nukleinsäureanalysen basierende Methoden gebräuchlich. Die Basenzusammensetzung der DNA, der sogenannte „GC-Wert“, wird zur Abgrenzung von Taxa herangezogen, ermittelt über so unterschiedliche Verfahren wie thermische Denaturierung (NAKASE & KOMAGATA 1968, STENDERUP & BAK 1968, MEYER & PHAFF 1969, NAKASE & KOMAGATA 1971), Dichtegradientenzentrifugation (STORCK 1966, STORCK & ALEXOPOULOS 1970) oder auch HPLC-Analytik (HAMAMOTO *et al.* 1986). DNA-DNA- oder auch DNA-RNA-Reassoziationsverfahren hingegen werden zum Quantifizieren von sogenannten „Homologien“ als Nachweis für Konspezifität eingesetzt. Auch hierbei sind unter-

schiedlichste Methoden zum Einsatz gekommen, von Hybridisierungsverfahren mit filtergebundener DNA (BAK & STENDERUP 1969, BICKNELL & DOUGLAS 1970, MENDONÇA-HAGLER & PHAFF 1975), über die Bestimmung der Denaturierungstemperatur von Heteroduplex-DNA (DUTTA *et al.* 1976) hin zur Analyse von Renaturierungskinetiken (MARTINI & PHAFF 1973, PRICE *et al.* 1978, KURTZMAN *et al.* 1980a, KURTZMAN *et al.* 1980b). Häufig wurden diese beiden molekularen Merkmale vergleichend untersucht und ergänzend eine Bewertung ihrer Aussagekraft durch die Einbeziehung von nicht-molekularen Daten, die beispielsweise aus Kreuzungsversuchen stammten, erreicht. Für die Charakterisierung von pilzlichen Taxa und als Kriterium für Artabgrenzungen haben sich „GC-Wert“ und „DNA-DNA-Homologie“ bewährt, auch wenn bei beiden Merkmalen die diversen angewandten Analyseverfahren durchaus einen Einfluß auf die ermittelten Werte haben, und damit einige Auswertungsaspekte kritisch betrachtet werden können (für ausführliche Diskussionen siehe KURTZMAN 1985, JAHNKE 1987, KURTZMAN 1998).

Zu solchen mehr qualitative Daten liefernden Methoden traten bald schon DNA-Analyseverfahren hinzu, deren Ergebnisse auch die Berechnung von Dendrogrammen und so die Rekonstruktion des evolutiven Geschehens ermöglichten. Dies waren zum einen der Einsatz von Restriktionsendonukleasen und zum anderen die Gewinnung von Sequenzdaten. Durch die Entwicklung und Automatisierung der Polymerasekettenreaktion (= Polymerase Chain Reaction, PCR - SAIKI *et al.* 1985, MULLIS *et al.* 1986, MULLIS & FALOONA 1987, SAIKI *et al.* 1988) wurde die Erhebung molekularer Daten für vergleichende systematische Untersuchungen schließlich auch in großem Umfang möglich. Der dadurch mögliche leichtere Zugang zu molekularen Daten hat die phylogenetischen Analysen und die Systematik der letzten Jahre stark geprägt. PCR-gestützte Verfahren sind heute ebenso wesentlicher Bestandteil moderner phylogenetisch-systematischer Arbeiten wie auch populationsbiologisch-biogeographischer Untersuchungen. Sie erlauben eine zunehmend feinere genetische Ähnlichkeitsanalyse und finden damit auch für inner- und zwischenartliche Differenzierungen Anwendung, wo sie die Charakterisierung von Arten bzw. Stämmen revolutioniert haben.

### **Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (= RFLPs)**

Mit dem Einsatz von Restriktionsendonukleasen werden entweder relativ einfache Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen bestimmt oder auch aufwendigere Restriktionsstellenkartierungen durchgeführt (NATHANS & SMITH 1975, MICHELMORE & HULBERT 1987, BRUNS *et al.* 1991). Dabei wird meistens genomische oder Gesamt-DNA, teilweise aber auch nur mitochondriale DNA aufgespalten. Aus dem so entstehenden Fragmentgemisch erfolgt der spezifische Nachweis homologer DNA-Fragmente normalerweise durch das Hybridisieren gegen eine ausgewählte Sonde. Bei allen im Laufe der Zeit eingesetzten, unterschiedlichen methodischen Vorgehensweisen ist für systematische und phylogenetische Untersuchungen

die Auswahl der DNA-Sonde ausschlaggebend. Es sind dementsprechend unterschiedliche, früher zumeist über Klonierung gewonnene DNA-Fragmente als Sonden zur Anwendung gekommen. Sehr verbreitet sind Abschnitte der ribosomalen Gencluster oder auch der mitochondrialen DNA. Es kommen aber auch andere, z.T. sogar unbekannte Genomabschnitte (sogenannte „Zufallsklone“) zum Einsatz. Restriktionskarten der gesamten mitochondrialen DNA fanden beispielsweise ebenso Anwendung zur Charakterisierung von Stämmen von *Neurospora crassa* Shear & B.O.Dodge (TAYLOR *et al.* 1986) wie für phylogenetische Untersuchungen bei nah verwandten Arten in Gattungen wie *Suillus* P.Karst. (BRUNS & PALMER 1989). Restriktionskarten der ribosomalen DNA erlaubten bei einer Kakteen besiedelnden Hefe z.B. die Diskussion ihrer Verbreitung (LACHANCE 1990). RFLP-Analysen mit Sonden unterschiedlicher mitochondrialer und/oder ribosomaler DNA-Bereiche wurden vielfach zu phylogenetischen Analysen herangezogen (z.B. innerhalb der Gattungen *Aspergillus* Link oder *Laccaria* Berk. & Broome - KOZLOWSKI & STEPIEN 1982, GARDES *et al.* 1990, GARDES *et al.* 1991a), zur Klärung intraspezifischer Fragestellungen (z.B. zur Abgrenzung biologischer Arten bei *Armillaria mellea* (Vahl) P.Kumm. oder Gruppen des Pflanzenpathogens *Rhizoctonia solani* J.G.Kühn - ANDERSON *et al.* 1987, ANDERSON *et al.* 1989, VILGALYS & GONZALEZ 1990a) sowie zur Identifizierung einzelner Taxa (z.B. bei pflanzenpathogenen oder Mykorrhizapilzen - EGGER *et al.* 1991, HENSON 1992). „Zufallsklone“ hingegen wurden häufig eingesetzt, um Sonden zur Identifizierung von Stämmen oder Arten zu finden („randomly cloned fragments“ CARDER & BARBARA 1991, MARMEISSE *et al.* 1992). Die PCR hat mittlerweile nicht nur die Amplifikation von bekannten DNA-Abschnitten als Sonden technisch vereinfacht, sondern sie kann sogar die Informationen für eine Sonde selbst liefern („randomly amplified fragments“ PIPE *et al.* 1995). In einzelnen Fällen wurde bei Restriktionsanalysen der mtDNA oder rDNA auf den Einsatz einer Sonde auch ganz verzichtet. Die entstandenen Restriktionsfragmente wurden dann direkt, ausschließlich aufgrund ihrer in Gelelektrophoresen ermittelten Größen, miteinander verglichen (MCARTHUR & CLARK-WALKER 1983, MAGEE *et al.* 1987, JENG *et al.* 1991).

### **PCR-Fingerprinting, DNA-Fingerprints und PCR basierte Fingerprints**

Von VILGALYS & HESTER wurde 1990 in einer Arbeit zur Identifizierung von Arten der Gattung *Cryptococcus* Vuill. für die taxonomische und phylogenetische Analyse bei Pilzen eine vereinfachte RFLP-Analyse als sogenanntes „PCR Fingerprinting“ eingeführt: Die Restriktion von spezifischen, mittels PCR amplifizierten DNA-Abschnitten zur Erzeugung spezifischer Muster bei elektrophoretischer Auftrennung der entstandenen Fragmente. Auch bei diesem Verfahren erfolgt die Zuordnung von Fragmenten rein über eine Größenbestimmung; die Charakterisierung homologer Fragmente über eine Hybridisierung entfällt.

Nur vereinzelt wurde dieses PCR Fingerprinting durch eine zusätzliche Kartierung der Restriktionsschnittstellen ergänzt („PCR Mapping“ VILGALYS & HESTER 1990, HOPPLE JR. & VILGALYS 1994). Wie die klassischen RFLP-Analysen findet auch das PCR Fingerprinting auf niedrigem systematischen Niveau für phylogenetische Untersuchungen bei nah verwandten Arten oder zur Bestimmung innerartlicher Unterschiede vielfältige Anwendung, wohingegen es für großsystematische Fragestellungen nicht eingesetzt wird. Zur Klärung phylogenetischer Zusammenhänge und für Artabgrenzungen werden überwiegend größere und kodierende Bereiche der rDNA mit diesem Verfahren charakterisiert, wie beispielsweise innerhalb der Basidiomyceten bei dem Verwandtschaftskreis der Gattungen *Lentinus* Fr. und *Lentinula* Earle (HIBBETT & VILGALYS 1991, MOLINA *et al.* 1992) oder in der Gattung *Phellinus* Quéf. (FISCHER 1996), bei verschiedensten Hefegattungen (MOLINA *et al.* 1993, SHEN *et al.* 1994, DLAUCHY *et al.* 1999), oder auch bei den Morcheln innerhalb der Ascomyceten (BUNYARD *et al.* 1994, 1995). Kürzere und variabelere Abschnitte der rDNA, zumeist die Spacer-Regionen, werden häufig für intraspezifische Differenzierungen und zur Artidentifizierung bei schwierig anzusprechenden Taxa herangezogen, so z.B. bei Pflanzenparasiten (CUBETA *et al.* 1991, WARD & AKROFI 1994, EDEL *et al.* 1996), Pilzparasiten (KISS 1997), Insektenparasiten (NEUVÉGLISE *et al.* 1994) und Mykorrhizapilzen (HENRION *et al.* 1994, ERLAND 1995, PRITSCH *et al.* 1997, GLEN *et al.* 2001).

Schon 1985 wurde der Begriff „DNA Fingerprinting“ geprägt (JEFFREYS *et al.*) woran der Begriff „PCR Fingerprinting“ angelehnt wurde. Bei DNA Fingerprints entstehen taxonspezifische bzw. individuelle Fragmentmuster durch eine RFLP-Analyse, bei der die eingesetzten Sonden nicht wie bei den oben beschriebenen RFLPs auf nur einen einzigen Genort zielen, sondern auf repetitive, im Genom mehrfach auftretende DNA-Motive, wie beispielsweise die Minisatelliten. Bei solchen Multilokus-Ansätzen wird gleichzeitig eine Vielzahl homologer Restriktionsfragmente detektiert, und es ergeben sich aufgrund der Hypervariabilität derartiger Genorte so sehr spezifische und individuelle Muster. Auch DNA Fingerprints wurden bald mit PCR-basierenden Methoden durchgeführt (siehe WEISING *et al.* 1995). Einerseits wurden von den Sonden klassischer DNA Fingerprints ausgehend PCR-Primer abgeleitet, andererseits wurden aber auch spezielle PCR-Anwendungen entwickelt, die ohne genaue Kenntnis des Genoms Polymorphismen nutzen, um spezifische Fragmentmuster zu erzeugen, z.B. die „RAPD-Analyse“ oder „AP-PCR“ (WELSH & McCLELLAND 1990, WILLIAMS *et al.* 1990) oder die „AFLP-Analyse“ (VOS *et al.* 1995). Auch bei Pilzen fanden sowohl klassische DNA Fingerprints (MEYER *et al.* 1991) wie auch PCR-basierende Fingerprints (MOKROUSOV & BULAT 1992, MEYER *et al.* 1993, VAN BELKUM *et al.* 1993, MAJER *et al.* 1996) bald Anwendung. Aufgrund dieser „PCR based Fingerprints“ ist der Begriff „PCR Fingerprinting“ nicht mehr ganz eindeutig und für die Restriktionsanalyse von PCR-Produkten hat sich das Kürzel „PCR-RFLPs“ eingebürgert, das auch in dieser



Arbeit im Weiteren Verwendung finden wird.

### **rRNA bzw. rDNA als molekulare Marker**

Bei all den verschiedenen methodischen Ansätzen in der molekularen Systematik hat sich schon früh ein Merkmalskomplex als relativ leicht zugänglich und als vielseitig einsetzbar herauskristallisiert: Die ribosomalen RNAs und die für sie kodierenden Gene. Bei den RFLPs und PCR-RFLPs wurden sie gerade angesprochen, aber erste Einsätze hatten sie auch bei den oben geschilderten DNA-DNA- bzw. DNA-RNA-Reassoziationsverfahren schon, wo Homologien der 26S rRNA bestimmt wurden (BICKNELL & DOUGLAS 1970, BAHARAEEN *et al.* 1983, KWOK *et al.* 1986). Vor allem aber bei Sequenzvergleichen, die bei systematischen und phylogenetischen Arbeiten zunehmend einen breiten Raum einnahmen und -nehmen, sind sie stark vertreten (OLSEN *et al.* 1986, BLANZ & UNSELD 1987, BRUNS *et al.* 1991, HILLIS & DIXON 1991, VAN DE PEER *et al.* 1992b, KURTZMAN & BLANZ 1998, BERBEE & TAYLOR 2001). Sie sind in allen Organismenreichen ein häufig benutzter molekulare Marker. Dies hat seinen Ursprung nicht nur in ihrer frühen Sequenzierbarkeit sondern auch in ihrer universellen Verbreitung als Hauptkomponente der Ribosomen, deren Feinstruktur mittlerweile ebenso aufgeklärt ist, wie auch die funktionelle Schlüsselrolle der rRNAs bei der Proteinbiosynthese nachgewiesen wurde (BAN *et al.* 2000, CARTER *et al.* 2000, CECH 2000, NISSEN *et al.* 2000, WILLIAMSON 2000, WIMBERLY *et al.* 2000). Die Fülle an rRNA bzw. rDNA-Daten wird zusätzlich zu den allgemeinen Sequenzdatenbanken in speziellen Datenbanken gesammelt, ausgewertet und aufbereitet, in denen sich außer den primären Sequenzdaten u.a. auch Alignments und Sekundärstrukturmodelle finden ([‘http://www.rna.icmb.utexas.edu’](http://www.rna.icmb.utexas.edu) COMPARATIVE RNA WEB SITE, [‘http://rdp.cme.msu.edu/html’](http://rdp.cme.msu.edu/html) RIBOSOMAL DATABASE PROJECT II, [‘http://rrna.uia.ac.be’](http://rrna.uia.ac.be) THE rRNA WWW SERVER, GUTELL *et al.* 1993, GUTELL 1994, MAIDAK *et al.* 2001, WUYTS *et al.* 2001, CANNONE *et al.* 2002, WUYTS *et al.* 2002). Die heute zur Verfügung stehende Menge an Vergleichsdaten bietet einen erheblichen Vorteil dieses Markers bei phylogenetischen Analysen, und umgekehrt erlaubt sie über vergleichende Analysen auch Rückschlüsse auf rRNA-Struktur und Funktion („Comparative Analysis“ WOESE *et al.* 1983, WOESE & PACE 1993, GUTELL *et al.* 1994, MICHEL & COSTA 1998).

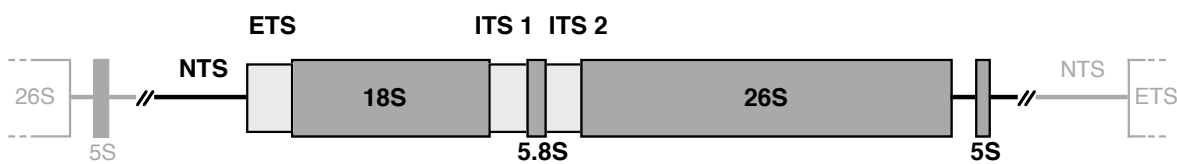
Bei Pilzen sind es die mit Abstand am meisten benutzten Marker, da ihnen die bei höheren Pflanzen viel verwendeten plastidären Marker wie beispielsweise das für die große Untereinheit der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase kodierende *rbcL*-Gen (CHASE *et al.* 1993) oder auch die Introns und Spacer der dortigen tRNA-Gene (TABERLET *et al.* 1991) fehlen. Zunehmend werden aber auch in der Mykologie Ansätze verfolgt, proteinkodierende Gensequenzen und damit anders evolvierende Marker zu erschließen (zur Problematik einzelner Gen-Stammbäume siehe PAMILO & NEI 1988, DOYLE 1992, MADDISON 1997) - z.B. die Chitin Synthetase, den Translationselongationsfaktor EF1 $\alpha$ , Bereiche der

Histon- oder  $\beta$ -Tubulingene, das RPB2-Gen einer Untereinheit der RNA Polymerase II oder auch das *atp6*-Gen einer ATPase-Untereinheit (BOWEN *et al.* 1992, GLASS & DONALDSON 1995, KRETZER & BRUNS 1999, LIU *et al.* 1999, THON & ROYSE 1999, O'DONNELL *et al.* 2001). Für die rDNA, die mit ihren Tandem-Repeats eigentlich eine Multigenfamilie darstellt, wird im allgemeinen von einem Evolutionsverhalten ausgegangen, das dem eines Single-Copy-Genes entspricht. Das Phänomen der Homogenisierung der rDNA-Repeats über Mechanismen wie ungleiches Crossing-over und Genkonversion wird mit den Begriffen der „Concerted Evolution“ und des „Molecular Drive“ umschrieben (DOVER 1982, ARNHEIM 1983, GERBI 1985, HILLIS *et al.* 1991, DOVER 1994, GANLEY & SCOTT 2002). Bei der Rekonstruktion von Stammbäumen braucht daher die Orthologie-Paralogie-Problematik von Genfamilien normalerweise nicht berücksichtigt zu werden. Mit der zunehmenden Zahl an Arbeiten, die rDNA-Abschnitte als molekulare Marker verwenden, werden aber auch Ausnahmen bekannt. Eine Heterogenität der rDNA ist bei einigen Pilzen feststellbar, und die Unterschiede werden entweder als Allelformen oder als paraloge Gene interpretiert (O'DONNELL & CIGELNIK 1997, AANEN *et al.* 2001, KAUSERUD & SCHUMACHER 2001).

### **Struktur eukaryotischer rRNA und ihrer Gene**

Zum besseren Verständnis des auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten Merkmalskomplexes sollen die Struktur und Organisation der nukleären ribosomalen RNA und ihrer Gene bei höheren Pilzen erläutert werden (allgemeine Angaben nach GERBI 1986, WARNER 1989, HENNIG 1998, PAULE 1998, WHITE 1998). Die Zellen höherer Pilze enthalten neben den cytoplasmatischen auch mitochondriale Ribosomen, die entsprechend im nukleären oder mitochondrialen Genom kodiert sind. Die große Untereinheit cytoplasmatischer Ribosomen wird von drei rRNAs (26S, 5.8S, 5S) und rund 50 Proteinen gebildet, während die kleine Untereinheit nur aus einer rRNA (18S) und gut 30 Proteinen besteht. Die beiden großen rRNAs zeigen zwischen verschiedenen Eukaryoten teilweise deutliche Größenunterschiede, weshalb sie häufig nur nach ihrer Lokalisation als „large subunit rRNA“ (LSU rRNA: 25S bis 28S, oder auch „23S-like“) bzw. „small subunit rRNA“ (SSU rRNA: 17S bis 18S, oder auch „16S-like“). Die nukleäre rRNA-Gene liegen als Multigenkomplex in tandemartigen Wiederholungen mit „head-to-tail“-Anordnung in vielfachen Kopien vor und werden auch als rDNA bezeichnet. Während die rDNA bei vielen Eukaryoten nur die 18S, 5.8S und 26S rRNA kodiert, ist bei Pilzen dort häufig auch das 5S rRNA-Gen lokalisiert (NATH & BOLLON 1977, GARBER *et al.* 1988). Allerdings wird es auch dort immer separat von der übrigen rDNA durch RNA Polymerase III transkribiert. Die RNA Polymerase I-Transkriptionseinheit des rDNA-Repeats umfaßt neben den drei rRNA-kodierenden Bereichen noch zwei interne transkribierte Spacer (ITS 1 und ITS 2), die diese kodierenden Abschnitte trennen, und am 5'-Ende einen externen transkribierten Spacer (5'-ETS). Auch das 3'-Ende

kann von einem kurzen externen transkribierten Spacer gebildet werden. Die einzelnen Transkriptionsbereiche eines rDNA-Repeats sind durch nicht-transkribierte Spacer (NTS), in denen die Transkriptionssignale liegen, voneinander getrennt. Dort im NTS ist, wenn es in das ribosomale Gencluster integriert ist, auch das 5S rRNA-Gen lokalisiert, wobei es auch in gegenläufiger Richtung auf dem Gegenstrang kodiert sein kann. Bei vielen Basidiomyceten und Hefen ist das 5S rRNA-Gen in den rDNA-Repeat integriert. Ansonsten kann es eigene Repeats bilden oder wie bei vielen filamentösen Ascomyceten und Hefen dispers im Kerngenom verteilt sein. Abb.1.1-1 zeigt schematisch den Aufbau der nukleären rDNA wie er sich bei Basidiomyceten findet.



**Abb.1.1-1:** Schema der Organisation der nukleären ribosomalen Gene in einem rDNA-Tandem-Repeat: Der Aufbau der rDNA am Beispiel von Basidiomyceten. Gezeichnet nach Angaben bei BUCKNER *et al.* (1988) und VILGALYS & GONZALEZ (1990b). Die transkribierten Bereiche sind als Balken dargestellt. Die RNA Polymerase I-Transkriptionseinheit besteht aus 5'-ETS, 18S rDNA, ITS 1, 5.8S rDNA, ITS 2 und 26S rDNA. Das RNA Polymerase III-Transkript umfaßt nur das 5S rRNA-Gen. Der nicht-transkribierte Spacer (NTS) ist in Relation verkürzt, mit Auslassungszeichen, als Linie dargestellt.

Aus dem primären Transkript der RNA Polymerase I, dem „rRNA-Precursor“, werden die transkribierten Spacer in einem Reifungsprozeß entfernt, so daß die drei getrennten rRNA-Moleküle entstehen. Die einzelnen Wiederholungen der rDNA-Repeats können bei unterschiedlichen Organismen sehr verschiedene Längen aufweisen - von unter 10 kb bei vielen Protozoen und Pilzen bis zu über 40 kb bei Säugetieren. Und auch die Kopienzahlen in den rDNA-Repeats können sehr unterschiedlich sein - von unter 100 bei einigen Pilzen bis zu über 10.000 bei höheren Pflanzen. Als Referenzen für Positionsangaben innerhalb der rRNAs dienen bei Eukaryoten häufig - auch in der vorliegenden Arbeit - die Sequenzen von *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C.Hansen (siehe Anhang I).

### rRNA- und rDNA-Sequenzierung

Aufgrund der großen Zahl an Ribosomen in den Zellen ließen sich cytoplasmatische rRNAs schon früh in einfachen Gesamt-RNA-Präparationen gewinnen oder über Gelelektrophorese

bzw. Dichtegradientenzentrifugation isolieren. Die kleineren 5S und 5.8S rRNAs waren so einer Sequenzanalyse für vergleichende phylogenetische Analysen direkt zugänglich (DONIS-KELLER *et al.* 1977, PEATTIE 1979, WALKER & DOOLITTLE 1982, GOTTSCHALK & BLANZ 1985). Für die größeren rRNAs wurde hingegen unter Nutzung von reverser Transkriptase eine Technik entwickelt, die zunächst die Gewinnung von Partialsequenzen erlaubte (QU *et al.* 1983, LANE *et al.* 1985, GUADET *et al.* 1989, GUÉHO *et al.* 1989, YAMADA & KAWASAKI 1989). Das aufwendigere Isolieren der rRNA-Gene und ihre Amplifikation über eine Klonierung für eine DNA-Sequenzierung wurde so meist umgangen, war aber für Totalsequenzen der größeren RNAs notwendig. Vor allem für die 18S rRNA wurden solche über die Klonierung ihrer Gene auch für phylogenetische Auswertungen gewonnen. Hierzu wurden aufgrund konservierter Abschnitte interne Sequenzierprimer entwickelt (ELWOOD *et al.* 1985, SOGIN & GUNDERSON 1987, HENDRIKS *et al.* 1991). Mit der so entstandenen Datenfülle war es dann möglich geeignete PCR-Primer zu entwickeln und damit auch längere rDNA-Abschnitte zu amplifizieren. Anfänglich wurden PCR-Produkte noch über einen anschließenden Klonierungsschritt sequenziert (MEDLIN *et al.* 1988), aber mit der Verbesserung der Techniken für die Sequenzierung von PCR-Produkten (GYLLENSTEN 1989, WHITE *et al.* 1990) wurde auch die direkte Sequenzierung von spezifischen PCR-Produkten Routine. Über die PCR wurden auch die nur auf DNA-Ebene analysierbaren Spacer-Regionen (ITS und NTS) für vergleichende Analysen zugänglich.

Die 5S rRNA wurde als erste rRNA in umfassenderen phylogenetischen Vergleichen ausgewertet. Während HORI 1975 mit den Sequenzen von nur 17 Taxa erste Aussagen zur Evolution von Pro- und Eukaryoten machen konnte, ließ sich 1985 (WALKER) mit über 100 Taxa und 1987 (HORI & OSAWA) schon mit 352 Taxa die Evolution der Großgruppen der Lebewesen nachzeichnen. Bei den höheren Pilzen wurden mit 5S rRNA-Daten erste Diskussionen zur Einteilung und Stellung der Basidiomyceten und Ascomyceten aufgrund von Sequenzanalysen geführt (WALKER & DOOLITTLE 1982, HUYSMANS *et al.* 1983, CHEN *et al.* 1984). Insbesondere innerhalb der Basidiomyceten wurde die Untergliederung und Zuordnung zu Gruppen, die als „Cluster“ bezeichnet wurden, mit diesem Marker untersucht (WALKER & DOOLITTLE 1983, BLANZ & GOTTSCHALK 1984, GOTTSCHALK & BLANZ 1984, WALKER 1984, BLANZ & GOTTSCHALK 1986). Heute findet die 5S rRNA praktisch keine Anwendung mehr, da dieses relativ stark konservierte, nur rund 120 Nukleotide umfassende Molekül mit seiner beschränkten Zahl an informativen Merkmalen nur für großsystematische Fragestellungen genutzt werden konnte. Zusätzlich können auch Paralogie-Probleme bei der Auswertung nicht ausgeschlossen werden, da die 5S rRNA-Gene bei Organismen außerhalb der Basidiomyceten meist eine Multigenfamilie bilden.

Für phylogenetische Analysen werden von der 18S rDNA mittlerweile überwiegend fast vollständige Sequenzen erhoben, während bei der deutlich größeren 26S rDNA auch

heute noch mit Partialsequenzen gearbeitet wird. Es werden häufig dabei mehr oder weniger universelle PCR-Primer verwendet (WHITE *et al.* 1990, Primer der VILGALYS-Arbeitsgruppe online unter '<http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>' CONSERVED PRIMER SEQUENCES FOR PCR AMPLIFICATION AND SEQUENCING FROM NUCLEAR RIBOSOMAL RNA). Aber zunehmend werden auch PCR-Primer für spezifische Fragestellungen bzw. für bestimmte Gruppen wie Mykorrhiza- oder Flechtenpilze entwickelt (z.B. GARGAS & TAYLOR 1992, GARDES & BRUNS 1993, EGGER 1995, DÖRING *et al.* 2000).

### **Die 18S und 26S rRNA als molekulare Marker**

Im nukleären rDNA-Repeat zeigen die verschiedenen Abschnitte unterschiedliche Evolutionsraten (RAUÉ *et al.* 1988, BRUNS *et al.* 1991, HILLIS & DIXON 1991, BRUNS & SZARO 1992). Die 18S rRNA gilt generell als langsam evolvierend, während die 26S rRNA mehr Variationen innerhalb des Moleküls und weniger Ähnlichkeiten zwischen stammesgeschichtlich weiter entfernten Taxa aufweist. Schneller evolvieren die Spacer-Bereiche, aber auch die mitochondrialen Gene zeigen eine höhere Variabilität als die entsprechenden nukleären Gene.

In der 18S rRNA wurden bei strukturellen Vergleichen über große phylogenetische Distanzen hinweg Regionen mit hoher Variabilität beschrieben (z.B. SPENCER *et al.* 1984, SOGIN & GUNDERSON 1987), die zusammenfassend zur Definition von neun variablen Regionen (V1 bis V9) führten, von denen allerdings bei Eukaryoten nur V4 größere Variabilität aufweist (DAMS *et al.* 1988). Die 26S rRNA (deren Sekundärstruktur in Anhang II abgebildet ist) wird in sechs strukturelle Domänen I bis VI untergliedert (NOLLER *et al.* 1981), innerhalb derer zum Teil deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Organismengruppen, v.a. auch innerhalb der Eukaryoten bestehen. Die Bereiche mit deutlichen Längen- und Sequenzunterschieden wurden bei Vergleichen über die Organismenreiche hinweg als Expansionsregionen („expansion segments“ CLARK *et al.* 1984) oder divergierende Regionen („divergent domains“ HASSOUNA *et al.* 1984, MICHOT *et al.* 1984) bezeichnet; insgesamt wurden 18 variable Regionen beschrieben (RAUÉ *et al.* 1988). In der molekularen Systematik, gerade auch der Pilze, haben sich zur Charakterisierung von variablen Abschnitten der 26S rRNA die Bezeichnungen der 13 divergierenden Regionen (D1 bis D12) durchgesetzt. Die auffälligen Größenunterschiede der LSU rRNA bei Eukaryoten liegen hauptsächlich in zwei dieser divergierenden Regionen begründet (MICHOT & BACHELLERIE 1987). Eingehende Vergleiche an rRNA-Sequenzen haben zur Festlegung von phylogenetisch konservierten Regionen in Sekundärstrukturmodellen ('<http://www.rna.icmb.utexas.edu>' COMPARATIVE RNA WEB SITE - „Phylogenetic conservation superimposed...“, GUTELL *et al.* 1993, GUTELL 1994, CANNONE *et al.* 2002) und sogar zur Festlegung der relativen Variabilität bzw. Evolutionsrate jeder einzelnen Basenposition innerhalb einer rRNA (VAN DE PEER *et al.* 1996, VAN DE PEER *et al.* 1997, ALI *et al.* 1999) geführt.

Ende der 80er und Anfang der 90er Jahre waren Partialsequenzen der 18S und 26S rRNA für phylogenetische Analysen beliebt. Bei der Bearbeitung höherer Pilze wurden v.a. durch KURTZMAN und Mitarbeiter (u.a. GUÉHO *et al.* 1989, 1990, KURTZMAN & LIU 1990, KURTZMAN & ROBNETT 1991, KURTZMAN 1993, MENDONÇA-HAGLER *et al.* 1993, KURTZMAN & ROBNETT 1994) sowie YAMADA und Mitarbeiter (YAMADA & KAWASAKI 1989, YAMADA *et al.* 1989a, YAMADA *et al.* 1989b, YAMADA *et al.* 1990, YAMADA *et al.* 1991, YAMADA & NAKAGAWA 1992, YAMADA *et al.* 1994, YAMADA *et al.* 1995) drei Primer genutzt, mit denen mit reverser Transkriptase jeweils ein kürzerer rRNA-Abschnitt, der selten länger als 250-300 bp war, sequenziert wurde. Einer dieser Primer ist am 3'-Ende der 18S rRNA lokalisiert und zwei in der 26S rRNA hinter der D2- und der D7b-Region. Eingesetzt wurden die Partialsequenzen zur Einordnung und Auflösung vieler Gruppen von Hefen, sowohl aus den Asco- als auch Basidiomyceten, und dabei auch zur Klärung von Anamorph-Teliomorph-Beziehungen. In zwei Arbeiten wurde zwar die Übereinstimmung der Topologie von Dendrogrammen gezeigt, die einerseits aus Partialsequenzen und andererseits aus Totalsequenzen der 18S rRNA errechnet worden waren (MCCARROLL *et al.* 1983, LANE *et al.* 1985), allerdings bei Analysen über weite phylogenetische Distanzen hin. Mit den verbesserten methodischen Möglichkeiten werden heute jedoch bei der 18S rDNA überwiegend fast vollständige Sequenzen und bei der 26S rDNA zumeist längere Partialsequenzen mittels PCR amplifiziert und analysiert.

Die 18S rRNA bzw. rDNA fand erste Einsätze in der Großsystematik. Auch mit ihr wurden Fragen über die Evolution der Hauptgruppen der Lebewesen über Reiche hinweg diskutiert (SOGIN *et al.* 1989, HENDRIKS *et al.* 1991, SOGIN 1994). Lange Zeit war es bei Pilzen der meist eingesetzte rDNA-Abschnitt, mit dem großsystematische Fragen zur Aufgliederung der höheren Pilze ebenso untersucht wurden wie die Untergliederung in Klassen oder die Eingliederung von Hefen in die Systeme ihrer filamentösen Verwandten (BRUNS *et al.* 1992, VANDE PEER *et al.* 1992a, SUGIYAMA & SUH 1993, SWANN & TAYLOR 1993, WILMOTTE *et al.* 1993, SWANN & TAYLOR 1995a, 1995b, SCHÜBLER *et al.* 2001). Auch Konvergenzerscheinungen und die Evolution von Lebensformen der Pilze wurden mit ihr untersucht (BERBEE & TAYLOR 1992, GARGAS *et al.* 1995). Die systematische Stellung vieler merkmalsarmer oder ungewöhnlicher Taxa bzw. solcher, deren systematische Stellung schon länger debattiert wurde, konnte mit Hilfe von 18S rDNA-Analysen geklärt werden. So wurde für die Gattungen *Taphrina* Fr. und *Saitoella* Goto, Sugiy., Hamam. & Komag. ihre Stellung als eigenständige Linie außerhalb der Euascomyceten aufgezeigt (NISHIDA & SUGIYAMA 1993), während *Mixia osmundae* (Nishida) C.L.Kramer aus diesem Bereich der Ascomyceten-Verwandtschaft ausgeschlossen und statt dessen eine Beziehung zu Basidiomyceten belegt wurde (NISHIDA *et al.* 1995). Auch die traditionell bei den Brandpilzen eingruppierten Microbotryales konnten endgültig der Verwandtschaft der Rostpilz (Urediniomyceten) zugeordnet werden, wo für sie eine eigene Unterklasse Microbotryomycetidae vorgeschlagen wurde

(SWANN *et al.* 1999). *Neolecta vitellina* (Bres.) Korf & J.K.Rogers mit seinen eigentümlichen Apothezien wurde als basaler filamentöser Ascomycet eingestuft und in eine eigene Ordnung gestellt (LANDVIK *et al.* 1993). Für die Wiederkäuer-Symbionten der Gattung *Neocallimastix* Vavra & Joyon ex I.B.Heath mit ihren mitochondrienfreien Zellen wurde eine Affinität zu den Chytridiomyceten ebenso nachgewiesen (BOWMAN *et al.* 1992) wie für den humanpathogenen Einzeller *Pneumocystis carinii* P.Delanoë & Delanoë mit seinem Protozoen-ähnlichen Lebenszyklus die Zugehörigkeit zu den echten Pilzen (EDMAN *et al.* 1988). Darüber hinaus wurde die 18S rDNA vielfältig eingesetzt, um Gattungen, Familien oder Ordnungen entsprechend ihren natürlichen Verwandtschaftsverhältnissen systematisch eingruppiert zu können (z.B. SPATAFORA & BLACKWELL 1993, SAENZ *et al.* 1994, ANDERSSON *et al.* 1995, TAKASHIMA & NAKASE 1996, WEDIN & TIBELL 1997). Die heute zur Verfügung stehende Menge an Sequenzinformationen läßt umfassende phylogenetische Studien mit 18S rDNA-Daten zu (TEHLER *et al.* 2000, VAN DE PEER *et al.* 2000).

Zunehmend werden bei Pilzen wieder Partialsequenzen der 26S rDNA eingesetzt. Schon bei den Arbeiten mit reverser Transkriptase wurde teilweise ausschließlich mit wenige hundert Basenpaare langen Partialsequenzen der D2- und/oder D1-Region nahe des 5'-Endes der 26S rRNA gearbeitet, maximal mit den etwa 600 bp der Domäne I (PETERSON & LOGRIECO 1991, GUÉHO *et al.* 1993, RAKOTONIRAINY *et al.* 1994, GUILLOT & GUÉHO 1995). Die Nachteile der reversen Transkriptase-Methodik, wie nur einzelsträngige Sequenzierung und die Erfassung eventueller posttranskriptioneller Veränderungen, sind mit der PCR-Technik entfallen, aber auch mit diesem Verfahren wird überwiegend die Domäne I amplifiziert und sequenziert (z.B. MONCALVO *et al.* 1993, BOEKHOUT *et al.* 1994, WEIB *et al.* 1998, ISSAKAINEN *et al.* 1999, DAHLMAN *et al.* 2000). Zum Teil finden dabei die schon mit der reversen Transkriptase verwendeten Primer als 3'-PCR-Primer Verwendung („635“ und „P3“ - GUADET *et al.* 1989, GUÉHO *et al.* 1989), aber es wurden auch zusätzlich neue Primer erprobt, die ebenfalls am Übergang von Domäne I zu Domäne II direkt hinter der variablen D2-Region liegen (z.B. „LR3“ und „NL4“ - <http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>, O'DONNELL 1992). Es wird seltener die gesamte Domäne II bis hinter die D6-Region zusätzlich zur Domäne I analysiert (MONCALVO *et al.* 1995b, MILLER *et al.* 2001), aber häufiger wird über die D2-Region hinausgehend noch die D3-Region oder sogar der Bereich bis hinter die D4- und D5-Regionen eingeschlossen (BRESINSKY *et al.* 1999, WINGFIELD *et al.* 1999, GRUBISHA *et al.* 2001, WAGNER & FISCHER 2001). In ihren Arbeiten über die Gattungen *Lentinus* bzw. *Ganoderma* P.Karst. konnten HIBBETT & VILGALYS (1993) und MONCALVO *et al.* (1995b) zeigen, daß die relativ kurzen, um die 600 bp langen Partialsequenzen der Domäne I oder auch nur die variable D2-Region allein tatsächlich ausreichend für phylogenetische Aussagen sind, da dieser 26S rDNA-Abschnitt einen großen Teil variabler bzw. phylogenetisch informativer Positionen aufweist. Bei fünf *Ganoderma*-Arten, die über die

Domänen I und II hinweg sequenziert worden waren, fanden sich Dreiviertel der variablen Positionen in der D2-Region, so daß für ein breiteres Artenspektrum allein diese analysiert wurde. Sequenzreaktionen bei 11 *Lentinus*-Arten, die die D1-, D2- und D4-/D5-Regionen abdeckten, zeigten ebenfalls sehr unterschiedliche Verteilungen der Variabilität. In der D1-Region waren immerhin 32% der Positionen variabel, in der D2-Region aber 62% und in der D4-/D5-Region nur 10%. 26S rRNA-Daten werden überwiegend bei relativ nah verwandten Taxa auf niedrigem taxonomischen Niveau verwendet, selten innerhalb von Ordnungen. Die 26S rDNA findet aber zunehmend auch Anwendung bei der Klärung größerer systematischer Zusammenhänge, beispielsweise bei der Gliederung der Basidiomyceten-Unterklasse Ustilaginomycetes sowie der Eingliederung einiger Anamorpher in diesen Verwandtschaftskreis (BOEKHOUT *et al.* 1995, BEGEROW *et al.* 1997, BEGEROW *et al.* 2000), bei anderen Heterobasidiomycetengruppen wie den auricularen Pilzen (BERRES *et al.* 1995, WEIB & OBERWINKLER 2001) und auch bei filamentösen Ascomyceten (LUMBSCH *et al.* 2000).

### **Die ITS-Regionen als molekularer Marker**

Mehrfach wurde in direkten Vergleichen gezeigt, daß die ITS-Region bei nächst verwandten Arten und innerhalb einer Art deutlich mehr Informationsgehalt aufweist als die relativ variable D2-Region der 26S rRNA und daher ITS-Daten zumindest wesentlich besser geeignet bzw. manchmal auch notwendig sind, um innerhalb einer Art oder eines Artkomplexes zu differenzieren (O'DONNELL 1992, ZAMBINO & SZABO 1993, MONCALVO *et al.* 1995a, MONCALVO *et al.* 1995b, STEWART *et al.* 1999, DODD *et al.* 2000). Bei dem Vergleich von rund 500 Ascomyceten-Hefen zeigten dann KURTZMAN & ROBNETT (1998) auch, daß die D1-/D2-Region der 26S rRNA zur Identifizierung und Unterscheidung der meisten Arten gut geeignet ist, aber zwischen Stämmen einer Art sich häufig keine oder nur sehr wenige unterschiedliche Basenpositionen finden. Sie postulieren aufgrund ihrer Daten, daß Stämme mit mehr als 1% Basenaustausche in der D1-/D2-Region verschiedenen Arten angehören und umgekehrt Stämme mit bis zu maximal drei Basenaustauschen entweder konspezifisch oder Schwester-taxa sind.

Die internen transkribierten Spacer werden überwiegend auch zur Analyse nächst verwandter Taxa herangezogen. Sie werden auf Gattungsebene zur Abgrenzung monophyletischer Gruppen genutzt und zur Zuordnung einzelner Stämme zu Arten (z.B. GARDES *et al.* 1991b, LEE & TAYLOR 1992, CURRAN *et al.* 1994, PAULUS *et al.* 2000) ebenso wie zu innerartlichen Differenzierungen. Es konnten beispielsweise eigenständige phylogenetische Linien innerhalb der Shiitake-Pilze bestimmt (HIBBETT 1995, HIBBETT *et al.* 1998) oder auch die sogenannte „Wirtsrassen“ („*formae speciales*“) bei Rostpilzen diskutiert werden (ZAMBINO & SZABO 1993). Die zwischenartliche Variabilität der ITS-Region liegt dabei i.d.R. deutlich höher als die innerartliche: In *Ganoderma* wurden unter 2% intraspezifische und über 6%



interspezifische Variabilität festgestellt (MONCALVO *et al.* 1995b). In einigen Fällen sind auch deutliche Unterschiede in der Variabilität zwischen den beiden internen transkribierten Spacern gefunden worden, wobei entweder ITS 1 oder ITS 2 die höhere Variabilität aufweisen kann (O'DONNELL 1992, MONCALVO *et al.* 1995a, DODD *et al.* 2000). Dies kann bei einer getrennten phylogenetischen Auswertung beider Spacer durchaus auch zu abweichenden Topologien der Dendrogramme führen. Bei Analysen in der Gattung *Peniophora* Cooke waren die Unterschiede sogar so auffallend, daß ausschließlich ITS 2 für phylogenetische Interpretationen genutzt wurde, da mit ITS 1 aufgrund einer hohen intraspezifischen Variabilität schon Vertreter einer Art nicht zusammen clusterten (HALLENBERG *et al.* 1996). Die Variabilität der Spacer, v.a. wenn sie mit deutlichen Längenunterschieden verbunden ist, kann auch zu Schwierigkeiten mit dem Alignment führen, so daß Abschnitte des Alignments von phylogenetischen Analysen ausgeschlossen werden, weil sie nicht eindeutig sind (HARRINGTON & POTTER 1997, HIBBETT *et al.* 1998, YAO *et al.* 1999). Allerdings gibt es bei Pilzen auch Beispiele, wo in der ITS-Region keinerlei innerartliche Variabilität gefunden werden konnte (ANDERSON *et al.* 1998). Die ITS-Region findet selten auf höherem taxonomischen Niveau Anwendung. Sie wurde beispielsweise für Bearbeitungen der Mehltreiberpilze gewählt, wobei aber uneindeutige Bereiche des Alignments von der Analyse ausgeschlossen wurden (SAENZ *et al.* 1994) oder auf ihre Auswertung aufgrund der hohen Variabilität zu Gunsten von Partialsequenzen der 18S und 26S rDNA schließlich doch verzichtet wurde (MORI *et al.* 2000).

## **1.2 Die Gattung *Exobasidium* Woronin**

Von FÜCKEL wurde 1861 als Erreger auffallender Gallen an Blättern von *Vaccinium vitis-idaea* L. und leichter Deformationen an solchen von *V. myrtillus* L. ein pflanzenparasitischer Pilz identifiziert, den er *Fusidium vaccinii* nannte. Nach einer ausführlichen Untersuchung der Gallbildung an *V. vitis-idaea* stellte WORONIN (1867) diesen Pilz als *Exobasidium vaccinii* in eine eigene Gattung. Bald wurden sowohl die Besiedelung weiterer Pflanzenarten als auch abweichende Erscheinungsformen des Befallsbildes bekannt. So beschrieb FÜCKEL (1873/1874) selbst das Auftreten von *E. vaccinii* auf *Rhododendron ferrugineum* L.; dieser Pilz wurde jedoch schon von CRAMER (1875) als eigene Art *E. rhododendri* anerkannt (siehe auch bei GEYLER 1874). Von beiden Autoren wurde z.B. auch der Befall von *Vaccinium uliginosum* L. durch Exobasidien geschildert (CRAMER 1875, FÜCKEL 1876/1877). Nachdem noch von anderen Pflanzen lokale Erkrankungen ausgelöst durch Exobasidien, die z.T. auch als neue Arten betrachtet wurden, bekannt geworden waren, beschrieb SIEGMUND bereits 1879 eine weitere *Exobasidium*-Art, *E. myrtilli*, die nicht nur lokal umgrenzte Blattveränderungen oder -gallen hervorruft, sondern zur Veränderung ganzer

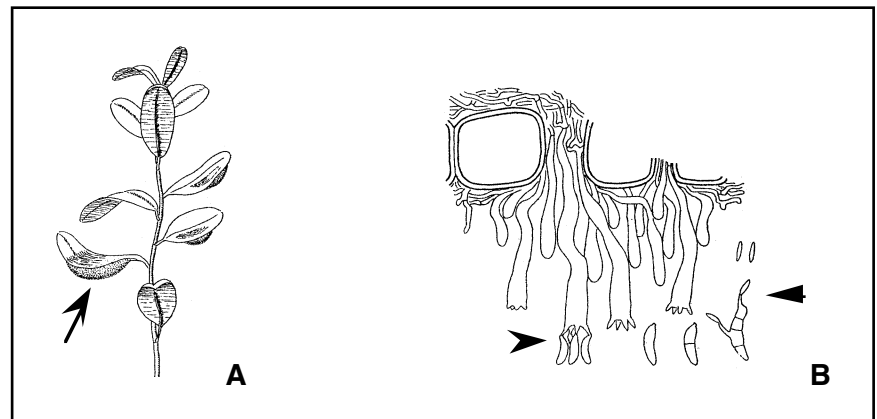
Zweige und Blätter bei *V. myrtillus* führt. Die Wirtspflanzen und Krankheitsbilder waren und blieben zwar häufig entscheidend für die Beschreibung von Exobasidien, aber früh kamen auch morphologische Unterschiede zum Tragen. So begründet BOUDIER die Beschreibung von *E. vaccinii-uliginosi* im Vergleich zu *E. vaccinii* auf Unterschiede der Sporengröße und Sterigmenzahl (BOUDIER & FISCHER 1894). Heute sind rund 50 Arten in der Gattung *Exobasidium* akzeptiert (KIRK *et al.* 2001).

Die Gattung *Exobasidium* ist in den gemäßigten Klimazonen weltweit verbreitet, besondere Verbreitungsschwerpunkte liegen in Nordamerika (BURT 1915, SAVILE 1959a) und Europa (DONK 1966, NANNFELDT 1981, ING 1994), aber auch aus Neuseeland (MCNABB 1962) und Japan (u.a. SHIRAI 1896, ITO & OTANI 1958, OTANI 1976, HIRATA 1981a) wurden etliche Arten beschrieben. Zwar sind schon länger zwei Exobasidien von Java bekannt (RACIBORSKI 1900), aber erst die gezielte Suche nach pflanzenparasitischen Pilzen in Costa Rica erbrachte in den letzten Jahren einen erstaunlichen Artenreichtum auch in tropischen Gebieten mit der Beschreibung einiger neuer Arten (GÓMEZ & KISIMOVA-HOROVITZ 1997, 1998). Exobasidien besiedeln vornehmlich Wirtspflanzen aus den Familien Ericaceae, Empetraceae und Epacridaceae (Ericales, Asteridae s.lat. - die systematische Stellung der höheren Pflanzen richtet sich nach STRASBURGER *et al.* 1998). In den gemäßigten Breiten stellen die Gattungen *Vaccinium* L. und *Rhododendron* L. viele Wirtsarten. Auch die meisten übrigen Wirte der Exobasidien stammen aus derselben Angiospermen-Unterklasse, so beispielsweise die im asiatischen Raum beheimatete Gattung *Thea* L. bzw. *Camellia* L. (Theaceae, Theales). Auf dem Teestrauch kommen gleich mehrere Arten vor (MASSEE 1898, ITO & SAWADA 1912), die als Pflanzenschädlinge auch wirtschaftliche Bedeutung erlangen. Jedoch sind einige Exobasidien auch von Wirtspflanzen aus anderen Verwandtschaftskreisen der Angiospermen bekannt. Ein Beispiel ist *Exobasidium warmingii* Rostr., das auf *Saxifraga* spp. (Saxifragaceae, Saxifragales, Rosidae s.lat.) lebt und von SAVILE (1959b) aufgrund geringer morphologischer Unterschiede in eine eigene Gattung gestellt wurde. *Arcticomycetes* Savile wird vielfach als synonym mit *Exobasidium* betrachtet (BAUER *et al.* 2001b, KIRK *et al.* 2001), jedoch deuten neueste molekulare Analysen auf eine Stellung basal oder außerhalb von *Exobasidium* hin (BEGEROW *et al.* 2002a). Weiterhin treten Exobasidien auf Vertretern der Lauraceae (Laurales, Magnoliidae) auf (siehe IJIMA *et al.* 1985). Das von GEYLER (1874) auf *Laurus canariensis* L. beschriebene *Exobasidium lauri* wurde von JÜLICH 1982 allerdings in eine eigene Gattung *Laurobasidium* gestellt. Neben einem unterschiedlichen Wirtsspektrum wurde das konstante Auftreten von Schnallen am Myzel als anatomischer Unterschied genannt. *Laurobasidium* wird noch heute als eigenständige Gattung geführt (KIRK *et al.* 2001) und aufgrund gastroider Basidien und molekularer Daten sogar aus der Familie Exobasidiaceae ausgegliedert (BAUER *et al.* 2001b, BEGEROW *et al.* 2002a).

Neben ihrer pflanzenparasitischen Lebensweise auf Angiospermen ist die Gattung

*Exobasidium* durch Holobasidien gekennzeichnet, die direkt zwischen Epidermiszellen, selten auch durch die Stomata hindurch wachsen und an der Oberfläche der Pflanzen als mehr oder weniger dichte Schicht eine Art Hymenium ausbilden, ohne daß ein eigentlicher Fruchtkörper angelegt wird (HENNING 1900, McNABB & TALBOT 1973). Ein auffälliges morphologisches Merkmal der Gattung sind ihre charakteristischen Basidien mit der außergewöhnlichen Art des Sporenansatzes an den Sterigmen (siehe Abb.1.2-1). An den Basidien sitzen die Basidiosporen den kräftigen, geraden, nicht gebogenen Sterigmen „verkehrt herum“ an, d.h. die Sporen sind zueinander gekrümmt (BLANZ 1978). Die konvexen Seiten der Sporen sind auf den Basidien einander zugekehrt, während die konkaven Seiten nach außen zeigen und der Hilaranhang abaxial liegt. Dies wurde lange als ein Charakteristikum der Exobasidiales angesehen (OBERWINKLER 1987), welches im Gegensatz zu den Verhältnissen bei fast allen anderen Basidiomyceten steht (siehe aber BEGEROW *et al.* 2000 für ein Auftreten exobasidialer Basidien außerhalb dieser Ordnung). Heute gilt der exobasidiale Basidientyp als plesiomorph innerhalb der Exobasidiales (BEGEROW *et al.* 2002a). Über die Freisetzung der Basidiosporen wurden stellenweise kontroverse Meinungen geäußert, es handelt sich jedoch um aktiv abgeschleuderte Ballistosporen (siehe OBERWINKLER 1982, BAUER & OBERWINKLER 1997, BEGEROW *et al.* 2002a). Die Basidiosporen teilen sich durch den Einzug von Querwänden und bilden danach an kurzen „Keimschläuchen“ über eine enteroblastische Konidienbildung eine oder mehrere Sproßzellen (MIMS & RICHARDSON 1987), die in Anlehnung an die Verhältnisse in anderen Pilzgruppen im Laufe der Zeit unterschiedlich bezeichnet wurden (Konidien, Sporidien, Sekundärsporen, Mikrokonidien, Blastosporen). Aus diesen Sproßzellen geht ein saprotroph wachsendes, haploides Hefestadium hervor. Das Keimverhalten mit Ausbildung eines Hefestadiums, welches schon von WORONIN (1867) und BREFELD (1889) detailliert beschrieben wurde, macht man sich auch zur Anlage von Kulturen auf Nährmedien zunutze. Mit diesen passiv verbreiteten Konidien werden neue Wirtspflanzen besiedelt. Schon die Beobachtungen von WORONIN zeigen, daß im Gegensatz zur Kultivierung in Nährmedien die Konidien auf den Wirtspflanzen einzeln mit Hyphen auskeimen und diese durch die Stomata oder Epidermiszellen hindurch wachsend die Pflanze infizieren. In Infektionsversuchen konnte die gesamte Entwicklung ausgehend von einzelnen Sporen oder Konidien erzeugt werden, wobei keinerlei Hinweise auf das Vorhandensein von unterschiedlichen Kreuzungstypen (+/- Sporen) und einen Heterothallismus gefunden wurden (GRAAFLAND 1957, 1960). Auch die Fusion von keimenden Sporen oder Konidien konnte weder in Kultur noch auf Pflanzenoberflächen beobachtet werden. Daraus und aus Experimenten zum Infektionsverhalten, sowie der Tatsache, daß die Basidiosporen einkernig sind (EFTIMIU & KHARBUSH 1927, GRAAFLAND 1960, MIMS *et al.* 1987), muß gefolgert werden, daß Exobasidien homothallisch sind und die Dikaryotisierung innerhalb des wachsenden Myzels in den Wirtspflanzen erfolgt. Karyogamie und Meiose finden in den Basidien statt, allerdings nicht wie bei anderen holobasidiaten Formen direkt aneinander anschließend im Zentrum der sich

entwickelnden, morphologisch schon differenzierten Basidie. Die Karyogamie und der Beginn der Meiose finden in einer äußerlich weitgehend undifferenzierten Zelle statt und wird in der sich dann auch morphologisch differenzierenden Zelle beendet. Da das Kern- und Zelldifferenzierungsverhalten dabei Anklänge an die Verhältnisse bei der Bildung von Phragmobasidien zeigt, wurden auch die Begriffe „Probasidie“ und „Metabasidie“ für die Stadien der Basidiendifferenzierung benutzt, obwohl keinerlei Unterteilung der Basidie erfolgt (MIMS *et al.* 1987). Mit ihrem Wechsel von einzelliger, knospender Haplophase und dikaryotischem Myzel zählen sie zu den typischen dimorphen Basidiomyceten mit Hefestadium (OBERWINKLER 1987, BANDONI 1995, BOEKHOUT *et al.* 1998).



**Abb.1.2-1:** *Exobasidium vaccinii* auf *Vaccinium vitis-idaea*. Zeichnung aus STRASBURGER (1998 S.571), verändert. **A.** Habitus einer befallenen Pflanze. Eine Galle ist mit Pfeil gekennzeichnet. **B.** Mikroskopische Details des Hymeniums. Zwischen den Epidermiszellen bricht das Myzel mit Basidien hervor, worauf die typisch zueinander gekrümmten Basidiosporen sitzen (gekerbte Pfeilspitze), die nach der Bildung von Quersepten mit Konidien keimen (gerade Pfeilspitze).

Als Pflanzenparasiten durchwuchern Exobasidien interzellulär das Gewebe ihrer Wirtspflanzen, um dann auf der Pflanzenoberfläche ein weißliches Hymenium auszubilden, das ausschließlich von Basidien gebildet wird. Befallene Pflanzenteile können durch einfache, fleckartige Veränderungen auffallen oder durch den Pilz zu hypertrophem Wachstum und Gallbildung angeregt werden. Neben solch lokal begrenzten Symptomen treten auch komplexere Krankheitsbilder auf, bei denen ganze Sproßabschnitte, ein Jahresaustrieb oder eine komplette Pflanze betroffen sind. Schon THOMAS (1897) unterschied auf *Vaccinium* spp. zwei Befallstypen, die er aber alle nur einer *Exobasidium*-Art, *E. vaccinii* zuordnete. Um-

grenzte Infektionserscheinungen einzelner Blätter, Blattstücke oder seltener auch Zweigstücke bezeichnete er als „forma circumscripta“, während er mit „forma ramicola“ den Befall ganzer Laub- oder Blüten sprosse bzw. zumindest ihrer oberen Enden bis hinauf zur Triebspitze umschrieb. Ähnlich grenzte LIND (1913) zwei Befallstypen ab, einen lokal umgrenzten Typ („circumscribed“) und einen die Wirtspflanze oder Teile von ihr mit Myzel durchwachsenden Typ („penetrating“). NANNFELDT (1981) schließlich unterscheidet bis zu drei unterschiedliche Befallsbilder bzw. Infektionsformen. Neben einem lokalen Befall, bei dem nur ein eng abgegrenzter Gewebebereich von Myzel durchwachsen wird („circumscribed“), unterscheidet er einen echten systemischen Befall, bei dem ganze Pflanzen oder zumindest größere Teile von dem Pilz besiedelt werden („systemic“) und einen lokalen Befall, der aber nicht eng umgrenzt bleibt, sondern bei dem das Myzel auch größere Abschnitte der Pflanze durchwächst („surculicolous“). Bei dem systemischen Befallstyp überdauert das Pilzmyzel in den Pflanzen, womit die Erkrankung mehrjährig ist. Bei dem surculicolosen Befallstyp hingegen sterben die betroffenen Pflanzenteile mit der Sporulation des Pilzes zumeist ab und die Infektion ist damit nur einjährig bzw. muß jedes Jahr über Sporen oder Konidien erneuert werden. NANNFELDT gibt einen ausführlichen Überblick über die von Exobasidien ausgelösten Infektionen und Befallsbilder. Normalerweise werden vegetative Organe, insbesondere Blätter und Knospen befallen, was zu extremen Gallbildungen wie bei *E. giganteum* S.Hirata oder gar der Ausbildung von Hexenbesen wie bei *E. pentasporium* Shirai führen kann (SHIRAI 1896, HIRATA 1981b). Aber auch im Sproßbereich können abgegrenzte Gallen gebildet werden, wie bei den durch *E. parvifolii* Hotson hervorgerufenen bizarren Strukturen auf *V. parvifolium* Sm. (HOTSON 1927). Durch *E. vaccinii* wird zwar vereinzelt auch der Blütenbereich befallen (WORONIN 1867), aber mit *E. flos-cavendishiae* Kisim.-Hor. & Gómez ist auch eine *Exobasidium*-Art bekannt geworden, die ausschließlich die Brakteen der Blütenstände befällt (GÓMEZ & KISIMOVA-HOROVITZ 1997). Berichte über die Basidienbildung auf Früchten liegen hingegen kaum vor (CLINE 1998). Die Untersuchungen u.a. der Anatomie der von *E. vaccinii* induzierten Gallen (WORONIN 1867) und der Infektionen mit *E. camelliae* var. *gracile* Shirai (WOLF & WOLF 1952) zeigen, daß durch die Exobasidien eine Hypertrophie des pflanzlichen Gewebes ausgelöst wird, wohl durch vom Pilz gebildete Indolessigsäure. Häufig zeigen befallene Pflanzenteile eine auffällige Rot- oder Gelbverfärbung. Später erscheint die Oberfläche durch Sporen und Konidien weiß bepudert, nachdem die Basidien mit der Ausbildung des Hymeniums i.d.R. die Kutikula durchbrechen oder in seltenen Fällen wie bei *E. camelliae* var. *gracile* die äußeren Blattzellschichten abgesprengt haben. Der Parasitismus der Exobasidien wurde auch auf zellulärer und zytologischer Ebene untersucht. Neuere elektronenmikroskopische Untersuchungen haben einen besonderen Typ der Interaktion zwischen Pilz und Wirt mit der Ausbildung komplexer Interaktionsapparate nachgewiesen, die typisch für den Verwandtschaftskreis der Exobasidien sind und über pilzliche Vesikel gebildet werden (BAUER *et al.* 1997, BAUER *et al.* 1998, BEGEROW *et al.* 2002a).

Bei den Exobasidien ist aufgrund ihrer fehlenden Fruchtkörperbildung ein ganzer, in der Pilzsystematik normalerweise verwendeter, wichtiger Merkmalskomplex gar nicht ausgebildet. Neben den Basidien und Basidiosporen sind die Konidien eines der wenigen Merkmale, das überhaupt zur morphologischen Charakterisierung der *Exobasidium*-Arten herangezogen werden kann. Die Arten der Gattung *Exobasidium* sind jedoch untereinander morphologisch sehr ähnlich und zeigen zusätzlich eine gewisse Variabilität bei solchen Merkmalen. Beispielsweise wurde die Anzahl der Sterigmen, d.h. der Sporen pro Basidie, zur Beschreibung von Arten herangezogen. BLANZ (1977, 1978) konnte jedoch zeigen, daß die Sterigmenzahl selbst bei benachbarten Basidien innerhalb eines Hymeniums variabel sein kann. Da sie arm an stabilen morphologischen Merkmalen sind, stellen die Wirte und die hervorgerufenen Symptome ein wichtiges Kriterium zur Charakterisierung von Exobasidien dar. Die Abgrenzung von *Exobasidium*-Arten aufgrund der Wirte und Befallsbilder und auch die Gewichtung dieser Merkmale im Verhältnis zu rein pilzlichen Merkmalen wurde im Laufe der Zeit sehr unterschiedlich gehandhabt. Unterschiedlichste Auffassungen wurden zur Artabgrenzung geäußert, und sie blieb fraglich. Einerseits gibt es sehr weit gefaßte Konzepte mit recht wenigen akzeptierten Arten, die häufig v.a. die Sporengrößen betonen und Wirte sowie Befallsbilder kaum berücksichtigten (BURT 1915, SAVILE 1959a). Andererseits gibt es Konzepte, die verstärkt die Erkrankungen und Wirtspflanzen gewichten, enger gefaßt sind und dementsprechend meist mehr Arten beinhalten (JUEL 1912, LIND 1913, DONK 1966). Teilweise überlappen die Artabgrenzungen bzw. die Zuordnungen einzelner Formen zu bestimmten Arten in diesen Konzepten, je nachdem welches Kriterium in den Mittelpunkt gerückt wurde.

1981 erfolgte durch NANNFELDT eine monographische Bearbeitung der europäischen Exobasidien, die in der Neubeschreibungen von 10 Arten resultierte. Es sind darin für Europa 27 Arten akzeptiert und beschrieben. Das NANNFELDTsche Artkonzept stützt sich neben Basidien-, Sporen- und Konidienmerkmalen hauptsächlich auf die oben schon erläuterten Infektionsformen, d.h. auf die Befallsbilder sowie Wirtspflanzen. Es umschreibt wirtsspezifische Pilze, die i.d.R. nur auf einer Pflanzenart vorkommen und dort ein spezifisches Befallsbild auslösen. Ausnahmen bilden einige wenige Exobasidien, die nah verwandte Wirtsarten besiedeln können, z.B. *E. unedonis* Maire auf *Arbutus andrachne* L. und *Arbutus unedo* L. oder *E. rhododendri* auf europäischen Rhododendren. Auf vielen Wirtsarten werden jedoch mehrere Exobasidien unterschieden. So führt NANNFELDT pro *Vaccinium*-Art bis zu drei unterschiedliche Exobasidien an. Für die in dieser Arbeit untersuchten europäischen Wirtsgattungen ist das NANNFELDTsche System in Tab.1.2-1 zusammengefaßt.

**Tab.1.2-1: In Europa vorkommende *Exobasidium*-Arten auf *Vaccinium* spp., *Rhododendron* spp. und *Andromeda polifolia* L. nach NANNFELDT.**  
Zusammenstellung der bei NANNFELDT (1981) für diese Wirte in Europa aufgeführten Exobasidien mit Angabe des charakteristischen Befallsbildes.

Wirt(e)	<i>Exobasidium</i> -Art	Befallsbild
<i>And. polifolia</i> L.	<i>E. karstenii</i> Sacc. & Trotter	einzelne (oder auch gehäufte), austreibende Sprosse mit verbreiterten Blättern
	<i>E. sundstroemii</i> Nannf.	austreibende Sproßbereiche, gehäuft, kaum verdickte Blätter
<i>Rh. ferrugineum</i> L. <i>Rh. hirsutum</i> L. <i>Rh. x intermedium</i> Tausch u.a. nah verwandte Arten	<i>E. rhododendri</i> (Fuckel) C.E.Cramer	Blattgallen
<i>Rh. luteum</i> Sweet	<i>E. dubium</i> Racib.	Blattflecken
	<i>E. horvathianum</i> (F.Thomas) Nannf.	Blattgallen
<i>Rh. indicum</i> (L.) Sweet u.a. Azaleen	<i>E. japonicum</i> Shirai	Blattgallen
	<i>E. pentasporium</i> Shirai	Hexenbesen
<i>V. myrtillus</i> L.	<i>E. arescens</i> Nannf.	Blattflecken
	<i>E. aequale</i> Sacc.	einzelne einjährige Sprosse mit verfärbenden Blättern
	<i>E. myrtilli</i> Siegm.	systemisch
<i>V. oxycoccos</i> L. <i>V. microcarpum</i> Turcz. <i>V. macrocarpum</i> Aiton	<i>E. rostrupii</i> Nannf.	Blattflecken
	<i>E. oxycocci</i> Rostr. ex Shear	einzelne verlängerte, einjährige Sprosse mit deformierten Blättern
<i>V. vitis-idaea</i> L.	<i>E. vaccinii</i> (Fuckel) Woronin	Blattflecken und -gallen, auch deformierte Sproßspitzen und Blütenknospen
	<i>E. splendidum</i> Nannf.	einjährige Triebe, auch in Büscheln
	<i>E. juelianum</i> Nannf.	systemisch
<i>V. uliginosum</i> L.	<i>E. pachysporum</i> Nannf.	Blattflecken
	<i>E. vaccinii-uliginosi</i> Boud.	einzelne einjährige Sprosse mit verfärbenden Blättern
	<i>E. expansum</i> Nannf.	systemisch

Eine Klärung der Artzugehörigkeit bzw. der Wirtsspezifität sowie der Spezifität von Befallsbildern wurde sich häufig von Infektionsversuchen versprochen. Schon WORONIN

(1867) infizierte Preiselbeerpflanzen, um die Identität von in Kultur gekeimten Basidiosporen/Konidien mit seinem *E. vaccinii* zu zeigen. Und RICHARDS konnte bereits 1896 zum einen zeigen, daß die Symptomatik auch vom Zeitpunkt der Infektion abhängig ist und zum anderen, daß Inokulationen mit *Exobasidium*-Sporen/Konidien von einer Wirtsart erfolgreich zu Infektion bei einer anderen Wirtsart führen konnten. Mit *E. parvifolii* wurde experimentell die Infektion bei zwei *Vaccinium*-Arten ausgelöst (HOTSON 1927). Durch Inokulationen mit Reinkulturen, die von verschiedenen Azaleen und von *V. vitis-idaea* gewonnen worden waren, konnte GRAAFLAND (1960) zeigen daß *E. japonicum* unterschiedliche Azaleen, aber nicht die Preiselbeere infizieren und umgekehrt mit *E. vaccinii* keine Erkrankung bei Azaleen ausgelöst werden kann. Dies wurde u.a. als Argument der Anerkennung von *E. japonicum* als eigenständige Art gewertet, wobei aber einschränkend erwähnt wurde, daß ein solches Verhalten bei nur physiologisch unterschiedenen Wirtsrassen ebenso auftreten würde. Die Untersuchungen von SUNDSTRÖM 1964 schließlich zeigten physiologische, morphologische und serologische Übereinstimmungen innerhalb und zumeist Unterschiede zwischen sogenannten „Wirtsrassen“, worunter er jeweils Exobasidien faßte, die von einer Wirtsart isoliert worden waren und dieselbe Symptomatik hervorgerufen hatten. Auch konnte SUNDSTRÖM in Infektionsversuchen keine Infektionen auf anderen Wirten auslösen, wenn auch z.T. die experimentellen Bedingungen und Kontrollen nicht optimal waren. Außerdem berichtet er von der zweimaligen Beobachtung des Phänomens einer „Doppelinfektion“ der Preiselbeere mit jeweils zwei unterschiedliche Exobasidien, wo zusätzlich zu dem systemischen Krankheitsbild noch eine Gallbildung auftrat. Diese Arbeiten von SUNDSTRÖM hatten großen Einfluß auf das NANNFELDTsche Artkonzept und die dortige starke Gewichtung der Wirtswahl und Befallsbilder. Neuere Infektionsexperimente mit einem *Exobasidium* von *V. angustifolium* Aiton brachten jedoch ein eher gegenteiliges Ergebnis, da dort typische Symptome auch bei drei weiteren von 14 getesteten *Vaccinium*-Arten ausgelöst wurden (NICKERSON & VANDER KLOET 1997). Infektionsversuche mit einzelnen oder wenigen *Exobasidium*-Isolaten scheinen also weniger geeignet zu sein, um allgemeingültige Aussagen zu treffen.

Die durch ihre Lebensweise und ihre morphologisch-anatomischen Besonderheiten interessante Gattung wurde seit Einführung molekularsystematischer Methoden mit unterschiedlichen Markern analysiert. Für eine Vielzahl von Isolaten war aufgrund von GC-Wert-Bestimmungen (BLANZ & OBERWINKLER 1983) oder auch DNA-DNA-Homologien (BLANZ 1986, BLANZ & DÖRING 1995) eine Artzuordnung bzw. die Feststellung von Konspezifität möglich. Die in diesen Arbeiten gefundenen Gruppen von *Exobasidium*-Stämmen (siehe Anhang III und IV) wurden als Arten interpretiert, deckten sich aber nicht in allen Fällen mit den nach dem NANNFELDTschen System zu erwartenden Gruppierungen. Beispielsweise wurden Gruppen von Stämmen gefunden (DNA-DNA-Homologie-Gruppe A und B bzw. GC-Wert-



Gruppe 1 und 2), die Isolate von verschiedenen *Vaccinium*-Arten beinhalteten, welche nach NANNFELDT unterschiedliche *Exobasidium*-Arten repräsentieren müßten. Der Befund widerspricht einer strengen Wirtsspezifität der *Vaccinium*-Parasiten. Andererseits wurden die von Rhododendren isolierten Exobasidien mit diesen molekularen Charakterisierungen in mindestens drei deutlich getrennte Arten (DNA-DNA-Homologie-Gruppen E, F und x bzw. GC-Wert-Gruppen 5, 6 und 7) unterteilt. Auch diese Aufteilung entspricht nicht der NANNFELDTschen Interpretation der *Rhododendron*-Parasiten. Sie korreliert auch nicht mit den Wirtsarten. Die GC-Wert-Analysen zeigen auch, trotz des morphologisch-anatomisch einheitlichen Erscheinungsbildes dieser auch durch ihre Lebensweise gut charakterisiert erscheinenden Gattung, eine erstaunliche Spannbreite (39,1% bis 68,1%). Die phylogenetischen Beziehungen der molekular charakterisierten *Exobasidium*-Arten zueinander oder gar ihre Stellung innerhalb der Basidiomyceten konnte mit diesen molekularen Methoden jedoch kaum erfaßt werden.

Die Zugehörigkeit der Gattung *Exobasidium* zu den Basidiomyceten ist aufgrund der Ausbildung einer unseptierten Holobasidie nie wirklich fraglich gewesen, auch wenn aufgrund der Lebensweise und äußeren Erscheinung die Analogien mit der Ascomycetengattung *Taphrina* öfters Erwähnung fanden (u.a. JUEL 1912, GÄUMANN 1926). Schon von WORONIN (1867) und FÜCKEL (1873/1874) wurden die Exobasidien zu den Hymenomyceten gestellt. Sie wurden der Familie Thelephoraceae zugeordnet oder zumindest mit dieser in eine Ordnung gestellt (BURT 1915, GÄUMANN 1926). Aber auch Gemeinsamkeiten im Lebenszyklus und anatomische Ähnlichkeiten mit den Dacrymycetales wurden immer wieder diskutiert (GÄUMANN 1926, DONK 1956, BLANZ 1978, OBERWINKLER 1978, JÜLICH 1981). Je nach Gewichtung verschiedener Merkmale und Eigenschaften für die großsystematische Gliederung der Basidiomyceten wurden sie mal den Homobasidiomycetidae bzw. den Holobasidiomycetidae (SAVILE 1955, MCNABB & TALBOT 1973 - Holobasidien), in neuer Zeit aber zumeist den Heterobasidiomyceten zugerechnet (DONK 1966, BLANZ 1978, JÜLICH 1981, OBERWINKLER 1982 - Vermehrung über Konidienbildung und hefeartiges Wachstum). Von HENNINGS (1900) wurden die Exobasidien bereits in eine eigene Ordnung und von JÜLICH (1981) sogar in eine eigene Unterklasse gestellt. Auch modernere Techniken und Marker führten durchaus zu unterschiedlichen Interpretationen der verwandtschaftlichen Beziehungen der Gattung. Aufgrund der Ultrastruktur der Septen und der Basidienentwicklung wurde eine Nähe zu den Uredinales postuliert (KHAN *et al.* 1981, MIMS 1982, MIMS *et al.* 1987), während *E. vaccinii* in der phylogenetische Analyse von 5S rRNA-Sequenzen von Basidiomyceten in ein Cluster gemeinsam mit gramminicolen Brandpilzen, *Tilletia controversa* J.G.Kühn und *Graphiola phoenicis* (Moug.) Pat. gestellt wurde, wobei die Sequenzen von *E. vaccinii* und *G. phoenicis* sogar identisch sind (WALKER & DOOLITTLE 1983, GOTTSCHALK & BLANZ 1985). Die Ergebnisse der 5S rRNA-Analyse bestätigten sich in chemotaxonomischen Untersuchungen an

Basidiomycetenhefen zur Zuckerzusammensetzung der Zellwände und einiger physiologischer Merkmale (LAASER 1989, DÖRFLER 1990, PRILLINGER *et al.* 1990b). Die Exobasidien wurden dem sogenannten „Ustilago-Typ“ der Basidiomycetenhefen zugeordnet, der neben *Exobasidium* die auf monokotylen Wirtspflanzen lebenden Teile der Gattung *Ustilago* (Pers.) Roussel und die ebenfalls pflanzenparasitischen Gattungen *Entyloma* de Bary, *Graphiola* Poit., *Microstroma* Niessl und *Tilletia* Tul. & C.Tul., sowie saprotrophe bzw. marine und humanpathogene Vertreter der anamorphen Gattungen *Tilletiopsis* Derx und *Sterigmatomyces* Fell umfaßt. Diskutiert wurde eine mögliche nähere Beziehung der Exobasidien zu *Entyloma* oder auch *Tilletia*.

Die Basidiomyceten werden heute nach phylogenetischen Analysen ribosomaler Gene in die drei Klassen Ustilaginomycetes, Hymenomycetes und Urediniomycetes gegliedert (SWANN & TAYLOR 1995b, BEGEROW *et al.* 1997). Die pflanzenparasitischen Ustilaginomyceten teilen sich aufgrund ultrastruktureller Merkmale, insbesondere der Septen und der Interaktionsbereiche der Parasit- und Wirtszellen, in drei Unterklassen: Ustilaginomycetidae, Entorrhizomycetidae und Exobasidiomycetidae (BAUER *et al.* 1997, BAUER *et al.* 2001b). Diese Gliederung wurde durch die Analyse von Teilsequenzen der 26S rDNA unterstützt (BEGEROW *et al.* 1997, BEGEROW 1998). Die meisten der oben genannten Gattungen des „Ustilago-Types“ finden sich gemeinsam mit den Exobasidien in der Unterklasse der Exobasidiomycetidae wieder; nur *Ustilago* selbst und *Sterigmatomyces* gehören den Ustilaginomycetidae an. Die Ordnung der Exobasidiales selbst umfaßt vier Familien (BAUER *et al.* 2001b). In den Exobasidiaceen sind neben *Exobasidium* nur noch die Gattungen *Arctomyces* und *Muribasidiospora* Kamat & Rajendren angesiedelt (BEGEROW *et al.* 2001, 2002a). Weitere, früher häufig als nächste Verwandte der Exobasidien betrachtete Gattungen finden sich in den drei übrigen Familien der Exobasidiales, *Laurobasidium* in den Cryptobasidiaceen, *Kordyana* Racib. in den Brachybasidiaceen und *Graphiola* in den Graphiolaceen, während die Gattung *Microstroma* in einer eigenen Ordnung Microstromatales in den Exobasidiomycetidae steht. Die phylogenetischen Analysen der 26S rDNA zeigen die Graphiolaceen als nächst Verwandte der Exobasidiaceen und legen eine Interpretation des exobasidialen Basidientyps als Apomorphie der Exobasidiomycetidae nahe (BEGEROW *et al.* 1997, 2001, 2002a).

### **1.3 Zielsetzung und Gliederung der Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit werden molekulare Daten zur Charakterisierung von *Exobasidium*-Stämmen vorgestellt. Der Schwerpunkt liegt dabei auf der Analyse von *Vaccinium*- und *Rhododendron*-Parasiten europäischer Herkunft. Mit Ausnahme von *E. reticulatum* Ito & Sawada, welches von *Thea sinensis* L. isoliert wurde, stammen alle Exobasidien von Wir-

ten aus der Familie Ericaceae. Ein Teil der hier bearbeiteten Stämme wurde schon in früheren Publikationen (BLANZ 1977, BLANZ & OBERWINKLER 1983, BLANZ 1986) behandelt, so daß zum Vergleich vielfältige Angaben wie GC-Wert- und DNA-DNA-Homologie-Daten vorliegen. Ziel ist es, die in den GC-Wert-Bestimmungen und mit den DNA-DNA-Hybridisierungen gefundenen Gruppen von *Exobasidium*-Stämmen näher zu charakterisieren und in Beziehung zu weiteren *Exobasidium*-Isolaten zu stellen. Die modernen, PCR-basierenden Methoden der molekularen Systematik gaben Anlaß die früher bearbeiteten Stämme in dieser Arbeit wieder aufzunehmen und mit feineren genetischen Analysen die Fragen der Artabgrenzung bzw. der Artzugehörigkeit einzelner Stämme nochmals aufzugreifen, zumal über phylogenetische Auswertungen auch die Beziehungen der Arten zueinander geklärt werden können und - v.a. auch mit Sequenzdatenvergleichen - eine Bewertung im Kontext der Basidiomyceten möglich ist. Es soll damit ein Beitrag zum Verständnis des Artkonzeptes innerhalb der Gattung *Exobasidium* geliefert und die Frage nach einer Koevolution von Parasit und Wirt beleuchtet werden.

Hierzu findet zunächst ein PCR-Fingerprinting-Verfahren Anwendung: PCR-RFLPs des 5'-Bereichs der 26S rDNA. Folgenden Fragen wird damit nachgegangen. Treten die Gruppierungen der Stämme, wie sie sich nach GC-Werten und DNA-DNA-Homologien darstellen, mit dieser Methode ebenso auf? Ist eine Eingruppierung weiterer Stämme in diese Gruppen mit einem solchen PCR-gestützten Verfahren möglich? Können einzelne Isolate über ein solches „molekulares Screening“ einer Art eindeutig und schnell zugeordnet werden? Wie stellen sich die Beziehungen der Stämme bzw. Gruppen in Dendrogrammen dar, die ausgehend von den Ähnlichkeiten der RFLP-Muster erstellt werden?

Die Bewertung einzelner, z.T. überraschender Befunde der PCR-RFLP-Analysen und die Erarbeitung phylogenetischer Hypothesen erfolgt anschließend mit Hilfe von Sequenzvergleichen. Es kommen dabei unterschiedliche Verfahren der Stammbaumrekonstruktion zur Anwendung, um ein möglichst genaues Bild von den Verwandtschaftsverhältnissen der untersuchten Taxa zu gewinnen. Sequenzdaten der Domäne I der 26S rDNA mit den variablen D1- und D2-Regionen, der 18S rDNA und der ITS-Region werden hierzu ausgewertet. Mit der Analyse dieser unterschiedlich schnell evolvierenden nukleären rDNA-Abschnitte sollen aufgrund der Ergebnisse der PCR-RFLPs ausgewählte Stämme möglichst umfassend charakterisiert werden. Im Mittelpunkt stehen dabei folgende Fragen. Wie stellen sich im Rahmen phylogenetischer Betrachtungen bei diesen Stämmen molekularsystematische Charakteristika wie GC-Werte, DNA-DNA-Homologien und PCR-RFLPs dar? Welche Aussagen zur Wirtsspezifität der Exobasidien, den ausgelösten Befallsbildern und zum Artkonzept lassen sich in Zusammenschau der molekularen Merkmale und im Vergleich zum NANNFELDTschen Konzept treffen?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Untersuchte Stämme

Die untersuchten *Exobasidium*-Stämme sind in der Kultursammlung von Prof. Dr. P. BLANZ, Karl-Franzens-Universität Graz enthalten. Der Ursprung der Stämme ist aus der Buchstabenkennung der Stammmummern ersichtlich:

CBS = Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn - Delft, Niederlande  
FO = Stammsammlung F. OBERWINKLER, Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
PB = Stammsammlung P. BLANZ, Karl-Franzens-Universität Graz, Österreich  
RBF = Raiffeisen Bio-Forschung, Tulln, Österreich (H. PRILLINGER)

Die Liste der untersuchten Stämme ist nach Wirtspflanzen und Stammmummern geordnet. Die Artzuordnung der Stämme richtet sich in dieser Auflistung nach den ursprünglichen, bei der Isolierung vergebenen Namen, unter denen die Stämme auch in früheren Publikationen geführt sind. Bei älteren Isolaten entsprechen diese daher nicht immer dem NANNFELDTschen Artkonzept, wie es sich in der aktuellen Bestimmungsliteratur für die europäischen *Exobasidium*-Arten widerspiegelt. Die Autoren der *Exobasidium*-Arten sind zumeist nach der Monographie von NANNFELDT (1981) und dem CBS-Katalog (CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES 1996) angegeben; einige Angaben wurden anhand der Originalliteratur korrigiert. Nomenklatur, Schreibweise und Autoren der Wirtspflanzen richten sich nach der FLORA HELVETICA (LAUBER & WAGNER 1996) und dem INDEX KEWENSIS (ROYAL BOTANIC GARDENS KEW 1997).

Die Sammelangaben (Fundort, Wirtspflanze etc.) für die FO-, PB- und RBF-Stämme sind nach Veröffentlichungen zusammengestellt (BLANZ 1977, BLANZ & OBERWINKLER 1983, PRILLINGER *et al.* 1990b, BLANZ & DÖRING 1995) und teilweise durch weitere Angaben von P. BLANZ und H. PRILLINGER (pers.Mitt.) ergänzt worden. Stammmummern mit Strichnummer (z.B. PB 4898-7) können dabei entweder unterschiedliche Kulturen kennzeichnen, die durch das Vereinzeln von getrennten Kolonien einer einzelnen Petrischale bei der Isolierung entstanden sind (sogenannte 'Einsporkulturen'), oder aber Kulturen unabhängiger Isolierungsansätze von einer befallenen Pflanze. Dies ist entsprechend vermerkt. Zur Information sind parallel in verschiedenen Stammsammlungen gehaltene Kulturen desselben Pilz-Isolates angegeben, wobei diejenigen in Klammern hier nicht bearbeitet wurden (DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Braunschweig, IFO = Institute for Fermentation, Osaka, Japan). Die Angaben für CBS-Stämme sind dem Katalog bzw. online-Verzeichnissen entnommen (CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES 1996, 'http://www.cbs.knaw.nl', 'http://www.ifo.or.jp/index\_e.html').

**Isolate von *Andromeda polifolia* L.**

PB 5635

*E. karstenii* Sacc. & Trotter, systemischer Befall ganzer Äste, Deutschland, Baden-Württemberg, Tübingen, Botanischer Garten, 5.6.1981

RBF 729

*E. karstenii* Sacc. & Trotter, systemischer Befall, F. OBERWINKLER (Herb. FO 25009)

RBF 732 (auch = CBS 682.93)

*E. karstenii* Sacc. & Trotter, systemischer Befall, Deutschland, Bayern, Moosen, Schönrammer Filz, 1.10.1986 (H. PRILLINGER 1986/151)

RBF 733

*E. karstenii* Sacc. & Trotter, systemischer Befall, Deutschland, Bayern, Moosen, Schönrammer Filz (benachbarter Standort zu RBF 732), 1.10.1986 (H. PRILLINGER 1986/152)

**Isolat von *Menziesia ferruginea* Sm.**

PB 4864-2, PB 4864-3, PB 4864-4

*E. rhododendri* (Fuckel) C.E.Cramer, lokaler Befall, Kanada, British Columbia, 22.7.1980, P. BLANZ

Die verschiedenen Kulturen von PB 4864 ('Strichnummern') sind als 'Einsporkulturen' durch Vereinzeln verschiedener Kolonien einer Petrischale bei der Isolierung angelegt worden.

**Isolate von *Rhododendron* spp. inklusive *Azalea indica* L.**

Anmerkung: Nach dem INDEX KEWENSIS (ROYAL BOTANIC GARDENS KEW 1997) sind *Rh. lateriticum* Planch. und *Azalea indica* L. synonym mit *Rh. indicum* Sweet. Originalangaben der Stammsammlungen sind in dieser Auflistung in Klammern hinter *Rh. indicum* (L.) Sweet angegeben.

Anmerkung: *Rh.* x *intermedium* Tausch = *Rh. ferrugineum* L. x *Rh. hirsutum* L. (CULLEN 1980).

CBS 153.85 = RBF 725 (auch = IFO 30756, DSM 4463)

*E. japonicum* Shirai, von *Rh. indicum* (L.) Sweet (*Rh. lateriticum* Planch.), Japan, T. YOKOYAMA No. 5306-12-2

CBS 157.85 (auch = IFO 30151, DSM 4522)

*E. shiraianum* Henn., von *Rh. degronianum* Carr., Japan, T. YOKOYAMA No. 5006-30-2

CBS 240.50

*E. rhododendri* (Fuckel) C.E.Cramer, von *Rh. hirsutum* L., W. GRAAFLAND

FO 24040-2

*E. rhododendri* (Fuckel) C.E.Cramer, von *Rh. ferrugineum* L., lokaler Befall, Schweiz,

Graubünden, Val Bever, 1.820 m, 09/1976, F. OBERWINKLER (Herb. FO 24040)

Für die Isolierung der Stämme FO 24040-1, FO 24040-2, FO 24040-3 und PB 4163 diente die gleiche infizierte Pflanze als Ausgangsmaterial in getrennten Isolierungsansätzen (keine 'Einsporkulturen').

FO 24040-3

*E. rhododendri* (Fuckel) C.E.Cramer, von *Rh. ferrugineum* L., lokaler Befall, Schweiz, Graubünden, Val Bever, 1.820 m, 09/1976, F. OBERWINKLER (Herb. FO 24040)

Siehe Anmerkung bei Stamm FO 24040-2.

FO 31767

*E. rhododendri* (Fuckel) C.E.Cramer, von *Rh. ferrugineum* L., lokaler Befall

PB 2857e

*E. rhododendri* (Fuckel) C.E.Cramer, von *Rh. x intermedium* Tausch, lokaler Befall mit Gallbildung, Deutschland, Baden-Württemberg, Tübingen, Neuer Botanischer Garten, 06/1975, P. BLANZ (Herb. PB 2857)

PB 3684

*E. japonicum* Shirai, von *Rh. indicum* (L.) Sweet (*Azalea indica* L. cultivar Hexe), lokaler Befall an Blättern, Deutschland, Baden-Württemberg, Tübingen, Gärtnerei Sillner, Gewächshaus, 8.3.1976, P. BLANZ (Herb. PB 3684)

PB 4163

*E. rhododendri* (Fuckel) C.E.Cramer, von *Rh. ferrugineum* L., lokaler Befall, Schweiz, Graubünden, Val Bever, 1.820 m, 09/1976, F. OBERWINKLER (Herb. FO 24040)

Siehe Anmerkung bei Stamm FO 24040-2.

PB 4380

*E. rhododendri* (Fuckel) C.E.Cramer, von *Rh. ferrugineum* L., lokaler Befall mit Gallbildung, Österreich, Tirol, Gerlos, 20.8.1978, B. OERTEL

PB 4381

*E. rhododendri* (Fuckel) C.E.Cramer, von *Rh. hirsutum* L., lokaler Befall, Deutschland, Bayern, Allgäu, Oberjoch, Iseler, Bergstation Lift - Gipfel, 1.700 m, 9.9.1978

PB 4898-3, PB 4898-7, PB 4898-9, PB 4898-16, PB 4898-17, PB 4898-18, PB 4898-19

*E. rhododendri* (Fuckel) C.E.Cramer, von *Rhododendron* spec., lokaler Befall mit Gallbildung, Kanada, British Columbia, Vancouver, Botanischer Garten, 21.7.1980

Die verschiedenen Kulturen von PB 4898 ('Strichnummern') sind als 'Einsporkulturen' durch Vereinzeln verschiedener Kolonien einer Petrischale bei der Isolierung angelegt worden.

PB 5634

*E. rhododendri* (Fuckel) C.E.Cramer, von *Rh. x intermedium* Tausch, lokaler Befall mit Gallbildung, Deutschland, Baden-Württemberg, Tübingen, Neuer Botanischer Garten,

5.6.1981 (gleicher Standort wie bei PB 2857e im Jahr 1975)

RBF 724 (auch = CBS 154.85, IFO 9957, DSM 4462)

*E. japonicum* Shirai, von *Rh. indicum* (L.) Sweet, 1974, A. EZUKA No. E-2

### **Isolat von *Thea sinensis* L.**

CBS 156.85 (auch = IFO 30393, DSM 4520)

*E. reticulatum* Ito & Sawada, von Blättern, Japan, T. YOKOYAMA No. 5107-3-1

### **Isolat von *Vaccinium myrtillus* L.**

PB 1828

*E. vaccinii* (Fuckel) Woronin, lokaler Befall, Deutschland, Bayern, Haspelmoor an der Bahnlinie München - Augsburg, 23.6.1974, P. BLANZ (Herb. PB 1828)

### **Isolate von *Vaccinium oxycoccus* L. und *V. macrocarpum* Aiton**

Anmerkung: Diese Arten werden von einigen Autoren und auch im INDEX KEWENSIS (ROYAL BOTANIC GARDENS KEW 1997) in die Gattung *Oxycoccus* Hill gestellt.

FO 31777

*E. vaccinii* (Fuckel) Woronin, von *V. oxycoccus* L., lokaler Befall, Deutschland, Bayern, Allgäu, Oberjoch, Kemnatsrieder Moor, 1.100 m, 17.9.1981

PB 3275

*E. vaccinii* (Fuckel) Woronin, von *V. oxycoccus* L., lokaler Befall, Deutschland, Bayern, Haspelmoor an der Bahnlinie München - Augsburg, 28.7.1975, P. BLANZ (Herb. PB 3275)

PB 3276

*E. oxycocci* Rostr. ex Shear, von *V. oxycoccus* L., systemischer Befall, Deutschland, Bayern, Haspelmoor an der Bahnlinie München - Augsburg, 28.7.1975, P. BLANZ (Herb. PB 3276)

Sammeldatum wie in BLANZ (1977), nicht 1976 wie in BLANZ & OBERWINKLER (1983).

PB 3277

*E. vaccinii* (Fuckel) Woronin, von *V. macrocarpum* Aiton, lokaler Befall, Deutschland, Bayern, Haspelmoor an der Bahnlinie München - Augsburg, 28.7.1975, P. BLANZ (Herb. PB 3277)

RBF 746

*E. rostrupii* Nannf., von *V. oxycoccus* L., lokaler Befall, Deutschland, Bayern, Boden-graben bei Neukirchen-Balbini, 17.8.1987, A. BRESINSKY (H. PRILLINGER 1987/44)

**Isolate von *Vaccinium uliginosum* L.**

FO 31778

*E. vaccinii* (Fuckel) Woronin, lokaler Befall, Deutschland, Bayern, Allgäu, Oberjoch, Kemnatsrieder Moor, 1.100 m, 17.9.1981

PB 383

*E. vaccinii* (Fuckel) Woronin, lokaler Befall, Deutschland, Bayern, Haspelmoor an der Bahnlinie München - Augsburg, 18.9.1973, P. BLANZ & F. OBERWINKLER (Herb. PB 383)

PB 4153

*E. vaccinii* (Fuckel) Woronin, lokaler Befall, Deutschland, Bayern, Haspelmoor an der Bahnlinie München - Augsburg, 23.8.1976, P. BLANZ (Herb. PB 4153)

RBF 737

*E. pachysporum* Nannf., lokaler Befall, Deutschland, Bayern, Mödishofener Moor östlich Dinkelscherben, 24.9.1987, K.H. PFAFF (H. PRILLINGER 1987/129)

**Isolate von *Vaccinium vitis-idaea* L.**

CBS 183.56

*E. vaccinii* (Fuckel) Woronin, Niederlande, W. GRAAFLAND

FO 31761

*E. myrtilli* Siegm., systemischer Befall, Deutschland, Bayern, Allgäu, Oberjoch, Iseler, Nordhang, 1.500 m, 15.9.1981

Wirt wie in Tab.1 in BLANZ & OBERWINKLER (1983), nicht *V. myrtilus* wie dort in "Materials" irrtümlich angegeben.

PB 393 = RBF 1008

*E. vaccinii* (Fuckel) Woronin, lokaler Befall, Deutschland, Bayern, Dürnbucher Forst bei Neukirchen zwischen Abensberg und Mainburg, 22.9.1973, P. BLANZ (Herb. PB 393)

PB 394

*E. myrtilli* Siegm., systemischer Befall peripherer Äste, Deutschland, Bayern, Dürnbucher Forst bei Neukirchen zwischen Abensberg und Mainburg, 22.9.1973, P. BLANZ (Herb. PB 394)

PB 1834

*E. myrtilli* Siegm., lokaler Befall der Blätter, Deutschland, Bayern, Dürnbucher Forst bei Neukirchen zwischen Abensberg und Mainburg, 25.6.1974, P. BLANZ (Herb. PB 1834)

PB 3385

*E. myrtilli* Siegm., Deutschland, Baden-Württemberg, Schwarzwald, Bärenthal, 3.9.1975,



P. BLANZ (Herb. PB 3385)

PB 4143

*E. myrtilli* Siegm., systemischer Befall, Deutschland, Baden-Württemberg, Schwarzwald, Calw, Würzbacher Moor zwischen Hirsau und Wildbad, 28.7.1976, F. OBERWINKLER (Herb. FO 23866)

Wirt wie in BLANZ (1977), PRILLINGER (1990b) und auch BLANZ & DÖRING (1995) und nicht *V. myrtillus* wie irrtümlich in BLANZ & OBERWINKLER (1983) angegeben, wo der Stamm in "Materials" auch als FO 23866 genannt ist.

RBF 726

*E. juelianum* Nannf., systemischer Befall, Österreich, Tirol, Stubaital, Abstieg Regensburger Hütte, 9.8.1986 (H. PRILLINGER 1986/58)

RBF 727

*E. juelianum* Nannf., systemischer Befall, Österreich, Tirol, Stubaital, Abstieg Regensburger Hütte (benachbarter Standort zu RBF 726), 9.8.1986 (H. PRILLINGER 1986/60)

RBF 763

*E. vaccinii* (Fuckel) Woronin, lokaler Befall (Gallen), Deutschland, Bayern, Nationalpark Bayerischer Wald, Hahnenfalz, 7.9.1987, N. LUSCHKA (H. PRILLINGER 1987/120)

RBF 765

*E. vaccinii* (Fuckel) Woronin, lokaler Befall (Gallen), Deutschland, Bayern, Schönramer Filz, 16.9.1987, H. SCHMID-HECKEL (H. PRILLINGER 1987/125A)

## **2.2 Molekulare Methoden**

Allgemeine Laborarbeiten wurden nach Standardprotokollen durchgeführt (siehe SAMBROOK *et al.* 1989). Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden, soweit nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen: Aldrich, Aug. Hedinger, BioRad, Boehringer, Difco, Gibco BRL, Merck, Pharmacia LKB, Roth, Sarstedt, Serva, Sigma. Für spezielle Laborausstattungen bzw. Geräte und Chemikalien sind die Hersteller bei der ersten Erwähnung aufgeführt.

### **2.2.1 Anzucht der Kulturen**

Die Stammhaltung der *Exobasidium*-Kulturen erfolgte in Schrägagarröhrchen mit dem am Lehrstuhl üblicherweise verwendeten Medium (MYP). Vor der DNA-Isolierung wurden die Stämme auf Petrischalen überimpft (Laminar Flow Cabinet, Class 100, Flow Laboratories), um wachsende Kulturen zur Verfügung zu haben. Die angeimpften Platten wurden einige

Tage bei RT gehalten und nach dem Anwachsen bei 15°C aufbewahrt. Alle Kulturen wurden spätestens vor der DNA-Isolierung lichtmikroskopisch unter Verwendung von Phasenkontrast kontrolliert (Labophot, Nikon).

#### MYP-Festmedium

7 g Malzextrakt  
0,5 g Hefeextrakt  
1 g Soyton (Difco)  
20 g Agar  
auf 1 l VE-Wasser, 20 min bei 120°C autoklaviert.

### **2.2.2 Isolierung von genomischer DNA**

Zur Vermeidung von Kontaminationen fanden bei DNA-Isolierungen und den späteren PCR-Ansätzen hohe Sicherheitsstandards Anwendung. Die Arbeiten wurden an einem Sterilarbeitsplatz (Typ LF 101, Fröbel) durchgeführt, Einmalhandschuhe und sterile/sterilisierte Hilfsmitteln wurden verwendet (z.B. Sterilfilterspitzen = plugged tips, FMC-Biozym), und es fand eine strikte Trennung von Chemikalien, Zubehör und v.a. Pipettensätzen (Pipetman, Gilson) zur Verwendung in „Vor-PCR-Arbeiten“ und „Nach-PCR-Arbeiten“ statt.

Mit einem Spatel wurde von den Pilzkulturen eine kleine Spatelspitze abgenommen und in ein 1,5 ml RG gegeben. DNA-Minipräparationen aus pilzlichem oder auch pflanzlichem Ausgangsmaterial bestehen aus drei Schritten: a) mechanischer Zellaufschluß mit Zugabe eines Lyse-Puffers, b) Proteindenaturierung mit Abtrennung der Proteine und c) Ausfällung der DNA. Zwei unterschiedliche Minipräparationsverfahren kamen hier zur Anwendung. Sie wurden nach Standardprotokollen zur Gewinnung pilzlicher DNA (z.B. TAYLOR & NATVIG 1987, BRUNS *et al.* 1990, LEE & TAYLOR 1990) modifiziert.

#### **1) Aufschluß mit detergenzienhaltigem Lyse-Puffer und Glass Beads**

(nach HOFFMANN & WINSTON (1987), modifiziert)

##### Detergenzienhaltiger Lyse-Puffer

Die Komponenten des Puffers wurden einzeln jeweils als 10x Vorratslösungen angesetzt, autoklaviert und bei RT aufbewahrt:

- \* 100 mM Tris-HCl pH 8
- \* 10 mM EDTA pH 8
- \* 1 M NaCl
- \* 20% v/v Triton X-100
- \* 10% w/v SDS

Zum Gebrauch wurden die Komponenten des Lyse-Puffers frisch zusammengegeben.

100  $\mu$ l des frisch angesetzten Lyse-Puffers wurde zu jeder geernteten Kultur in die RG gegeben und zum Suspendieren der Zellen gut durchmischt. Dann wurden 3/4 Vol. Glaskügelchen (0,2-0,3 g Glass Beads, 425-600  $\mu$ m, acid-washed, Sigma) zugegeben und zum Zellaufschluß 30-90 s auf einem Vortex intensiv geschüttelt (Vortex-Genie 2, Bender & Holbein AG). Anschließend wurden weitere 650  $\mu$ l Lyse-Puffer zugegeben und 45-75 min bei 65°C unter gelegentlichem Mischen inkubiert (Thermoblock Typ S-12-140, Liebisch). 700  $\mu$ l frisch gemischtes Chloroform-Phenol (1:1) wurden zugegeben (Chloroform - stabilisiert mit Ethanol, Merck; Phenol - redestilliert, in TE äquilibriert, pH 7,5-8, Roth), 30 s auf dem Vortex durchmischt und 10 min bei maximaler Drehzahl zentrifugiert (Mikro Rapid/K, Hettich). Die obere, wäßrige Phase wurde abgenommen und in ein neues 1,5 ml RG überführt. War diese wäßrige Phase sehr trüb, wurde die Chloroform-Phenol-Ausschüttelung wiederholt. Ansonsten wurde direkt 1 Vol. CIA (Chloroform-Isoamylalkohol 24:1) zugeben, 30 s gemischt und 5 min zentrifugiert. Die obere, wäßrige Phase wurde wiederum in ein neues 1,5 ml RG überführt. Falls nach der CIA-Ausschüttelung eine deutliche Zwischenschicht vorhanden war, wurde eine zweite CIA-Ausschüttelung angeschlossen. Andernfalls wurde die DNA durch Zugabe von 20  $\mu$ l 3 M Ammoniumacetat und 0,54 Vol. (= 380  $\mu$ l) kaltem Isopropanol (-20°C) ausgefällt.

## **2) Aufschluß mit Flüssigstickstoff und CTAB-haltigem Lyse-Puffer**

(nach DOYLE & DOYLE (1987) und ROGERS & BENDICH (1985), modifiziert)

### CTAB-haltiger Lyse-Puffer

3% w/v	CTAB	15 g
1% w/v	PVP (360.000)	5 g
1,4 M	NaCl	40,91 g
20 mM	EDTANa <sub>2</sub> pH 8,6	20 ml 0,5 M EDTANa <sub>2</sub> pH 8,6
100 mM	Tris-HCl pH 8	<u>25 ml 2 M Tris-HCl pH 8</u> auf 500 ml mit Aqua bidest., autoklaviert.

Die RG mit den Pilzkulturen wurden zum Tiefgefrieren in Flüssigstickstoff getaucht. Mit vorgekühlten Pistillen (Micropistill, Eppendorf, gewaschen in 10% Essigsäure und autoklaviert) wurde das Material zu feinem Pulver zermörsert, wobei die RG in mit Flüssigstickstoff gefüllten RG-Ständern standen. 500  $\mu$ l CTAB-Puffer (auf 50-60°C angewärmt) wurden zugegeben und mit Hilfe eines Pistilles gut gemischt, um eine homogene Suspension zu erhalten. Für etwa 1 h wurde bei 60°C inkubiert. Eine Chloroform-Phenol- und (mindestens) eine CIA-Ausschüttelung wurde anschließend wie oben beschrieben durchgeführt. Die DNA wurde mit 3 M Natriumacetat (1/10 Vol.) und kaltem Isopropanol (2/3 Vol.) ausgefällt.

Die RG mit der gefällten DNA wurden mehrmals gekippt, wobei ein DNA-Nieder-

schlag sichtbar werden sollte. Falls kein fädiger oder flockiger DNA-Niederschlag auftrat, wurden die Proben einige Zeit bei 4°C stehen gelassen. Dann wurde 15 min bei maximaler Drehzahl zentrifugiert, wonach die DNA meist als Pellet sichtbar war. Die DNA-Pellets wurden nach Dekantieren des Überstandes mit 1,5 ml kaltem 70%-igem Ethanol gewaschen und anschließend in der Vakuumzentrifuge (Speed Vac Concentrator, Savant) leicht getrocknet. Die DNA wurde je nach Pelletgröße in 50-100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Zum Lösen der DNA blieben die Proben ca. 30 min bei RT stehen. Dabei wurde gelegentlich durch Schnippen der RG vorsichtig gemischt. Aliquots der frisch isolierten DNAs wurden gleich für den späteren Einsatz in den PCRs verdünnt (1:10, 1:100, 1:1.000 und 1:10.000). Für baldige Nutzung erfolgte eine Aufbewahrung bei 4°C, ansonsten wurden die DNAs bei -20°C eingefroren.

Teilweise wurden isolierte DNAs nachträglich mit RNase (0,5 µg/µl, DNase free, Boehringer) behandelt, um eventuell störende, größere RNA-Mengen abzubauen. Nach 1 h Inkubation bei 37°C mit RNase (0,2 µl auf 15 µl DNA-Lösung) wurde die DNA durch Zugabe von 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat und 2-2,5 Vol. gekühltem Ethanol mit anschließender Zentrifugation pelletiert und entsprechend dem Ausgangsvolumen in H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### **2.2.3 Amplifikation von rDNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion**

In der Polymerasekettenreaktion (PCR) werden Genombereiche zwischen zwei bekannten Sequenzabschnitten, den sogenannten „Priming Sites“ (= Primerbindungsstellen), mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase spezifisch vervielfältigt. Hierzu wird zunächst die DNA thermisch denaturiert und in ihre Einzelstränge aufgeschmolzen. Anschließend lagern sich bei niedrigeren Temperaturen die „Primer“, zu den Priming Sites komplementäre Oligonukleotide, an die DNA an. Im letzten Schritt werden bei der Optimaltemperatur der Polymerase von diesen Primern ausgehend neue DNA-Stränge synthetisiert. Dieser Prozeß aus „Denaturierung“, „Annealing“ und „Extension“ wird zyklisch wiederholt, so daß eine exponentielle Amplifikation des durch die Primer flankierten DNA-Stückes erfolgt (WHITE *et al.* 1989, ARNHEIM & ERLICH 1992).

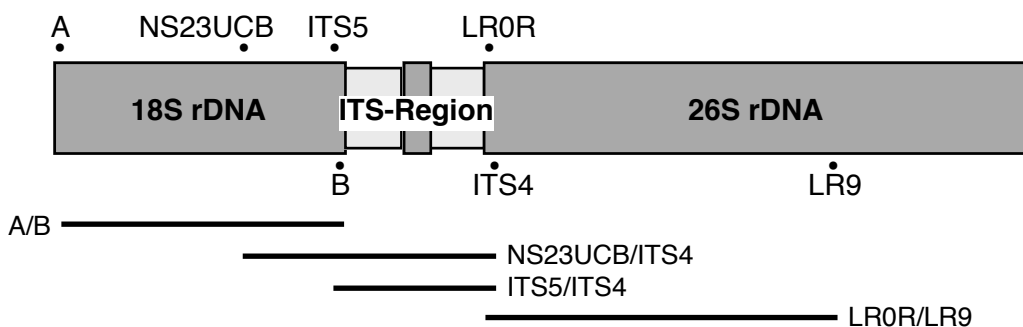
#### **2.2.3.1 Verwendete PCR-Primer**

Es wurden verschiedene Abschnitte des nukleären rDNA-Repeats mittels PCR amplifiziert, wobei unterschiedliche Primer zur Anwendung kamen (Tab.2.2.3.1-1). Sie amplifizieren i.d.R. die rDNA verschiedenster Eukaryoten, nur NS23UCB wurde spezifisch für Pilze entwickelt. Primer A und Primer B wurden für die vorliegende Arbeit modifiziert, indem die für

Klonierungszwecke an den 5'-Enden der Primer ursprünglich vorhandenen Polylinker weggelassen wurden. Die 18S rDNA wurde über die Primerkombination A/B vervielfältigt, die ITS-Regionen über ITS5/ITS4, das 3'-Ende der 18S rDNA inklusive der anschließenden ITS-Regionen über NS23UCB/ITS4 und der 5'-Bereich der 26S rDNA über LR0R/LR9 (Abb.2.2.3.1-1). Die PCR-Primer wurden als lyophilisierte Oligonukleotide von MWG-Biotech bezogen. Für Amplifikate der 26S rDNA, die für eine spätere manuelle Sequenzierung (siehe Kapitel 2.2.5.2) vorgesehen waren, wurde der Primer LR0R biotinyliert und HPLC-gereinigt benutzt.

**Tab.2.2.3.1-1: Angaben zu den verwendeten PCR-Primern.** Die Primer-Bezeichnungen entsprechen den Originalpublikationen. Richtungsangabe: forw. = forward, rev. = reverse. Die Position im rDNA-Repeat ist auf die Sequenzen von *Saccharomyces cerevisiae* bezogen (siehe Anhang I). Schmelztemperaturen ( $T_m$ , in °C) sind als „4°C pro G/C + 2°C pro A/T“ berechnet. Referenzen: (1) MEDLIN *et al.* (1988), (2) GARGAS & TAYLOR (1992), (3) WHITE *et al.* (1990), (4) 'http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm'.

Primer	Richt.	Position	Sequenz (5'→3')	$T_m$	Ref.
A (modifiziert)	forw.	18S: 3-21	CCTGG TTGAT CCTGC CAGT	60°	1
NS23UCB	forw.	18S: 1184-1203	GACTC AACAC GGGGA AACTC	62°	2
ITS5	forw.	18S: 1745-1766	GGAAG TAAAA GTCGT AACAA GG	62°	3
LR0R	forw.	26S: 26-42	ACCCG CTGAA CTTAA GC	52°	4
B (modifiziert)	rev.	18S: 1793-1775	ATCCT TCTGC AGGTT CACC	58°	1
ITS4	rev.	26S: 60-41	TCCTC CGCTT ATTGA TATGC	58°	3
LR9	rev.	26S: 2204-2188	AGAGC ACTGG GCAGA AA	52°	4



**Abb.2.2.3.1-1: Lage der PCR-Primer und Amplifikate im rDNA-Repeat.** Die „Forward“-Primer sind oberhalb, die „Reverse“-Primer unterhalb des Repeats eingezeichnet. Darunter sind die amplifizierten rDNA-Abschnitte angegeben.

### **Lösen der Oligonukleotide und Konzentrationsbestimmung**

Zu den lyophilisierten Oligonukleotiden (Synthesemaßstab 0,2  $\mu\text{mol}$ ) wurden 400  $\mu\text{l}$  10 mM Tris-HCl pH 8 gegeben. Nach dem Lösen des Lyophilisates wurden eventuell vorhandene Partikel des Syntheseträgermaterials abzentrifugiert (13.000 rpm, 5 min) und die Konzentration der Lösungen bestimmt. Die Primer-Vorratslösungen wurden aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Für den Einsatz in der PCR wurden die Vorratslösungen mit dem Tris-Puffer auf eine Konzentration von 10 pmol/ $\mu\text{l}$  (= 10  $\mu\text{M}$ ) verdünnt.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Vorratslösung 1:100 mit Tris-Puffer verdünnt und photometrisch in einer Quarzküvette bei 260 nm (UV/VIS Spectralphotometer Uvikon 810, Kontron) die Absorption im Verhältnis zu dem Tris-Puffer bestimmt. Bei einer Absorption von  $\geq 0,8$  wurde die Lösung weiter verdünnt, um in den linearen Messbereich zu gelangen. Nach Herstellerangaben (MWG-Biotech) läßt sich die Konzentration der Primerlösung wie folgt berechnen: „Molarität in  $\mu\text{M}$  =  $(100 \times \text{OD}_{260}) \div (1,54 \times \text{A} + 0,75 \times \text{C} + 1,17 \times \text{G} + 0,92 \times \text{T})$  mal Verdünnungsfaktor der Messung“.

#### **2.2.3.2 PCR-Ansätze und PCR-Profile**

Die PCR wurde im allgemeinen nach gängigen Protokollen und Empfehlungen von WHITE *et al.* (1990) oder PERKIN ELMER CORPORATION (1990) durchgeführt und optimiert. Die PCR-Reagenzien wurden aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren aufbewahrt; das zur Überschichtung verwendete Mineralöl (Light Mineral White Oil, Sigma) wurde bei RT gelagert. Alle Reagenzien wurden nach dem Auftauen kurz auf dem Vortex gemischt, anzentrifugiert und dann immer auf Eis gekühlt gehalten. *Taq* DNA-Polymerasen wurden von Boehringer und Eurogentec bezogen und mit den mitgelieferten 10x Polymerase-Puffern und  $\text{MgCl}_2$ -Lösungen verwendet. Ein 10x dNTP-Mix mit je 2 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP wurde verwendet (Desoxynucleosid-Triphosphat Set, Boehringer; jeweils 100 mM) und reinstes Wasser (LiChrosolv Wasser für die Chromatographie, Merck).

Alle PCR-Ansätze wurden grundsätzlich auf Eis zusammenpipettiert, um unspezifisches Primer-Annealing zu verhindern. Bei jeder PCR wurde als letzter Schritt immer eine Negativkontrolle mit  $\text{H}_2\text{O}$  statt DNA-Lösung zwecks Überprüfung auf Kontaminationen pipettiert. In Abhängigkeit von den verwendeten DNA-Polymerasen und zugehörigen Puffern ( $\text{MgCl}_2$ -enthaltend/ $\text{MgCl}_2$ -frei) kamen zwei leicht unterschiedliche Pipettierschemata für die PCR zur Anwendung. Die Reaktionskomponenten wurden ohne DNA-Lösung (= Template) als Mastermix zusammenpipettiert. Dieser wurde nach Zugabe der Polymerase gut gemischt (auf einem Vortex) und anzentrifugiert. Aliquots von je 15  $\mu\text{l}$  wurden in 0,6 ml RG verteilt

und mit 10  $\mu\text{l}$  Template versehen, mit der Pipette gemischt und mit Mineralöl überschichtet. Die RG wurden kurz zentrifugiert und die PCR in einem Thermocycler gestartet. Der PCR-Erfolg wurde anschließend über Agarosegelelektrophoresen kontrolliert und die PCR-Proben bis zur Weiterverarbeitung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die DNA-Mengen, die als Template eingesetzt wurden, sind mittels DNA-Verdünnungsreihen (bis 1:10.000) optimiert worden.

#### Ansatz für 25 $\mu\text{l}$ PCR-Reaktionsvolumen mit *Taq* DNA-Polymerase von Boehringer

7,40 $\mu\text{l}$	H <sub>2</sub> O	
2,50 $\mu\text{l}$	10x Puffer mit 15 mM MgCl <sub>2</sub>	(Endkonzentration 1,5 mM)
2,50 $\mu\text{l}$	10x dNTP-Mix	(Endkonzentration 200 $\mu\text{M}$ )
1,25 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{M}$ „Forward“-Primer	(Endkonzentration 12,5 pmol)
1,25 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{M}$ „Reverse“-Primer	(Endkonzentration 12,5 pmol)
0,10 $\mu\text{l}$	<u><i>Taq</i> DNA-Polymerase mit 5 U/<math>\mu\text{l}</math></u>	(Endkonzentration 0,5 U)
= 15,00 $\mu\text{l}$	Reaktionsmix	
+ 10,00 $\mu\text{l}$	DNA-Lösung	

#### Ansatz für 25 $\mu\text{l}$ PCR-Reaktionsvolumen mit DNA-Polymerase „Goldstar“ von Eurogentec

5,90 $\mu\text{l}$	H <sub>2</sub> O	
2,50 $\mu\text{l}$	10x Puffer, MgCl <sub>2</sub> -frei	
1,50 $\mu\text{l}$	25 mM MgCl <sub>2</sub>	(Endkonzentration 1,5 mM)
2,50 $\mu\text{l}$	10x dNTP-Mix	(Endkonzentration 200 $\mu\text{M}$ )
1,25 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{M}$ „Forward“-Primer	(Endkonzentration 12,5 pmol)
1,25 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{M}$ „Reverse“-Primer	(Endkonzentration 12,5 pmol)
0,10 $\mu\text{l}$	<u><i>Taq</i> DNA-Polymerase mit 5 U/<math>\mu\text{l}</math></u>	(Endkonzentration 0,5 U)
= 15,00 $\mu\text{l}$	Reaktionsmix	
+ 10,00 $\mu\text{l}$	DNA-Lösung	

Für verschiedene PCR-Primerkombinationen wurden PCR-Profile benutzt, die sich im Annealing- und Extensionsschritt unterschieden. Die Annealing-Temperatur richtete sich u.a. nach den Schmelzpunkten der Primer (siehe Tab.2.2.3.1-1) und die Extensionszeit nach der Länge des zu erwartenden PCR-Produktes. Auch sind die Profile auf die jeweils benutzten Thermocycler abgestimmt worden.

#### Amplifikation des 5'-Bereichs der 26S rDNA und der ITS-Regionen

Primerkombinationen LR0R/LR9 und ITS5/ITS4, mit Coy Tempcyler Model 60 (Fröbel).

Denaturierung bei  $94^{\circ}\text{C}$  für 3 min

30-35 Zyklen:	Denaturierung	$96^{\circ}\text{C}$	1 min
	Annealing	$50^{\circ}\text{C}$	1 min 10 s
	Extension	$72^{\circ}\text{C}$	2 min 30 s

Extension bei  $72^{\circ}\text{C}$  für 5 min.

Amplifikation eines Teiles der 18S rDNA inklusive der anschließenden ITS-Regionen

Primerkombination NS23UCB/ITS4, mit Hybaid Cycler Omnigene (MWG-Biotech).

Denaturierung bei 95°C für 3 min

35 Zyklen:	Denaturierung	95°C	1 min
	Annealing	55°C	1 min
	Extension	72°C	1 min 30 s

Extension bei 72°C für 7 min.

Amplifikation der 18S rDNA

Primerkombination A/B, mit TwinCycler II (Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH).

Denaturierung bei 94°C für 4 min

35 Zyklen:	Denaturierung	94°C	1 min
	Annealing	48°C	1 min
	Extension	72°C	2 min

Extension bei 72°C für 7 min.

**2.2.3.3 Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte und genomischer DNAs**Elektrophorese-Lösungen nach SAMBROOK *et al.* (1989)Stammlösung 50x TAE pH 8, Laufpuffer

242 g	Tris Base
57,1 ml	Eisessig
100 ml	0,5 M EDTA pH 8

auf 1 l mit Aqua bidest.

Zum Gebrauch mit Aqua bidest. auf 1x TAE (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA) verdünnt.

Stammlösung 5x TBE pH 8, Laufpuffer

54 g	Tris Base
27,5 g	Borsäure
20 ml	0,5 M EDTA pH 8

auf 1 l mit Aqua bidest.

Zum Gebrauch mit Aqua bidest. auf 0,5x TBE (45 mM Tris-Borat, 1 mM EDTA) verdünnt.

6x Gelladepuffer Nr. III

30% v/v	Glycerin
0,25% w/v	Bromophenol Blue (BioRad)
0,25% w/v	Xylene Cyanole FF (BioRad)

in Aqua bidest.

Es wurden Agarosegele mit Konzentrationen zwischen 0,6% und 1,5%, je nach aufzutrennender Fragmentgröße, hergestellt (MP Agarose, Boehringer; UltraPure Agarose,



Gibco BRL; SeaKem LE Agarose, FMC-Biozym). Die Elektrophoresen fanden in horizontalen Elektrophoresekammern statt (Werkstätten der Universitäten Tübingen und Bayreuth). Neben Kontrollgelen von 14 cm Länge x 10,5 cm Breite (40 ml Agarosegel) wurden zur genaueren Größenbestimmung Gele mit langer Laufstrecke (24 x 19,5 cm, 140 ml) benutzt.

Die Agarose wurde in Puffer (1x TAE oder 0,5x TBE) für jedes Gel frisch gelöst und aufgekocht. Nach dem Abkühlen der Agarose auf ca. 60-70°C wurde Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml; Endkonzentration 0,5 µg/ml) zugegeben, in die Gelform gegossen und diese nach dem Erstarren in die Gelkammer gelegt. Je 1 µl Ladepuffer wurde mit einem Aliquot der zu analysierenden Proben gemischt (4 µl PCR-Produkt bzw. 6 µl genomische DNA) und in die Geltaschen geladen. Zur Größenbestimmung wurden 5 µl eines DNA-Größenstandards aufgetragen. Für die Kontrolle von PCR-Produkten und genomischer DNA kamen zwei Standards mit einem weiten Spektrum an Fragmentgrößen zum Einsatz. Durch das Auftragen immer gleicher Mengen der Größenstandards war auch eine quantitative Abschätzung der mitlaufenden Proben möglich. Gebrauchsfertige Verdünnungen (1 µg DNA/6 µl) wurden mit 1x TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8) und 6x Ladepuffer hergestellt.

1kb DNA-Leiter (1 µg/µl, Gibco BRL), Fragmentlängen in bp: 12.216, 11.198, 10.180, 9.162, 8.144, 7.126, 6.108, 5.090, 4.072, 3.054, 2.036, 1.636, 1.018, 517, 506, 396, 344, 298, 220, 201, 154, 134, 75.

Standard Nr. VII (SPP1-DNA/Eco RI, 0,25 µg/µl, Boehringer), Fragmentlängen in bp: 8.000, 7.100, 6.000, 4.800, 3.500, 2.700, 1.900, 1.850, 1.500, 1.400, 1.150, 1.000, 680, 490, 370.

Die Elektrophorese in 1x TAE oder 0,5x TBE (Netzgerät GPS 200/400, Pharmacia LKB) wurde je nach Kammergröße bei 70-150 V durchgeführt und die Lauflänge anhand der Farbstoffe des Ladepuffers kontrolliert. Nach dem Lauf wurden die Gele unter UV-Fluoreszenz auf einem Transilluminator (Chromato-Vue, Model TM-20, 302 nm, UVP Inc.) ausgewertet. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte entweder über eine Sofortbildkamera (Polaroid MP-4 System, Polaroidfilm-Typ 667) oder über ein Video-Dokumentationssystem (Videoanlage Cybertech CS 1, CCD Kamera 28 mm Objektiv, 9 Zoll Schwarz-Weiss-Monitor) mit einem Videodrucker (Mitsubishi P68E).

#### **2.2.4 Spaltung von 26S rDNA PCR-Produkten mit Restriktionsendonukleasen**

Die Durchführung der PCR-RFLPs richtete sich nach den Angaben bei VILGALYS & HESTER (1990) und HIBBETT & VILGALYS (1991). Nach diesen Arbeiten wurden auch die verwendeten Restriktionsenzyme ausgewählt.

### **2.2.4.1 Aufreinigung der PCR-Produkte**

Vor der Restriktion durch die Endonukleasen wurden die PCR-Produkte i.d.R. mit einer Phenol-Ausschüttelung aufgereinigt, um störende Pufferzusätze zu entfernen. Waren die PCR-Produkte auch von Primer-Artefaktbanden („Primer-Dimeren“) zu trennen, so wurde eine Elution aus Agarosegelen vorgenommen. Pro Probe (= PCR-Produkt eines DNA-Isolates) wurden 120  $\mu$ l oder mehr (mindestens 3  $\mu$ g DNA) aufgereinigt.

#### **1) Phenol-Ausschüttelung mit anschließender Ethanol-Fällung**

1 Vol. frisch gemischtes CIA-Phenol (1:1) wurde zugegeben, 5 min per Hand langsam, aber kräftig geschüttelt und 1 min bei maximaler Drehzahl und 4°C zentrifugiert. Die obere, wäßrige Phase wurde abgenommen und in ein neues 1,5 ml RG überführt. 1 Vol. CIA (24:1) wurde zugegeben, nochmals 5 min geschüttelt und 1 min zentrifugiert. Die obere, wäßrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml RG überführt und durch Zugabe von 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat und 3 Vol. kaltem, absolutem Ethanol (-20°C) sowie Inkubation bei -20°C ( $\geq$ 1 h) wurden die PCR-Produkte ausgefällt. Danach wurden sie mit 30-45 min Zentrifugation bei maximaler Drehzahl und 4°C pelletiert. Die Pellets wurden mit 70%-igem Ethanol gewaschen und ca. 15 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die gereinigten PCR-Produkte wurden in 60  $\mu$ l 1x TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8) aufgenommen.

#### **2) Elution aus Agarosegelen mit dem USBioclean Kit**

Nach erfolgter Agarosegelelektrophorese (siehe dazu Kapitel 2.2.3.3) eines aufzureinigenden PCR-Produktes wurde die entsprechende Bande unter langwelligem UV-Licht (302 nm) aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA über Anhaftung an Glaspulver mittels des Kits „USBioclean MP for TAE & TBE Gels“ (USB) wieder gewonnen. Zur Elektrophorese der größeren Volumina wurden extra hohe Gele und ein Kamm mit extra breiten Taschen verwendet. Die Isolierung der DNA aus den Agaroseblöckchen (1% SeaKem GTG Agarose, FMC-Biozym in 1x TAE) mit dem Kit folgte den Angaben des Herstellers und die gereinigten PCR-Produkte wurden ebenfalls in 60  $\mu$ l 1x TE-Puffer aufgenommen. Zur Kontrolle wurde eine normale Agarosegelelektrophorese angeschlossen.

### **2.2.4.2 Restriktion der PCR-Produkte**

Die Restriktionsenzyme (Tab.2.2.4.2-1) wurden von den Firmen Appligene, Boehringer, Gibco BRL bzw. New England Biolabs in Konzentrationen von 2,5-40 U/ $\mu$ l bezogen. Sie wurden gemäß den Angaben der Hersteller und mit den jeweils mitgelieferten Puffern ver-

wendet. Pro zu analysierender Probe (= PCR-Produkt eines DNA-Isolates) und Enzym wurde ein 20  $\mu$ l-Reaktionsansatz mit 5-10 U Enzym in einem 1,5 ml RG zusammenpipettiert.

**Tab.2.2.4.2-1: Restriktionsendonukleasen der PCR-RFLP-Analysen.** Erkennungssequenzen der Enzyme mit eingezeichneter Schnittstelle.

Enzym	Erkennungssequenz
<i>Ava</i> II	G↓GWCC
<i>Cfo</i> I	GCG↓C
<i>Hae</i> III	GG↓CC
<i>Hinf</i> I	G↓ANTC
<i>Msp</i> I	C↓CGG
<i>Taq</i> I	T↓CGA

#### 20 $\mu$ l-Ansatz für die Spaltung von PCR-Produkten mit Restriktionsendonukleasen

10 $\mu$ l	gereinigtes PCR-Produkt (500-750 $\mu$ g DNA) in 1x TE
2 $\mu$ l	zugehöriger Enzympuffer (10x)
6-7,75 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O
0,25-2 $\mu$ l	Enzym (je nach Enzymkonzentration)
20 $\mu$ l	Reaktionsvolumen

Für parallel angesetzte Reaktionen mit einem Enzym wurde ein Mastermix (H<sub>2</sub>O, Puffer, Enzym) hergestellt, aliquotiert und dann die PCR-Produkte zugegeben. Auf einem Vortex wurde gut gemischt, kurz zentrifugiert und die Proben bei 37°C in einem Wärmeschrank (Typ B290, Heraeus) inkubiert. Die Ansätze mit *Taq* I wurden mit Mineralöl überschichtet und bei 65°C in einem Thermoblock (Typ S-12-140, Liebisch Bielefeld) inkubiert. Nach 3 1/2 bis 4 h wurden die Reaktionen durch Zugabe von 4  $\mu$ l Gelladepuffer (siehe folgendes Kapitel) und Einfrieren gestoppt.

#### **2.2.4.3 Elektrophoretische Auftrennung der Fragmente in hochauflösender Agarose**

Für diese Agarosegelelektrophorese wurde eine Spezialagarose (VisiGel Separation Matrix, Stratagene) verwendet, die kleinere DNA-Fragmente zum einen sehr gut aufzutrennen vermochte und zum anderen deren schwache Fluoreszenz aufgrund einer geringen Hintergrundfärbung der Gelmatrix besser erkennen ließ.

350 ml 1x VisiGel-TAE-Puffer wurden in einem Becherglas vorgelegt und 21 ml des gründlich gemischten Flüssigkonzentrats mit einer Glaspipette unter Rühren langsam zuge-

geben sowie 12  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml). Die Lösung wurde so lange aufgekocht, bis nur noch große Luftblasen aufstiegen, worauf ein eventueller Flüssigkeitsverlust durch Zugabe von Aqua bidest. sofort ausgeglichen wurde. Die Lösung wurde zügigst in eine große Gelform (24 x 19,5 cm) gegossen.

#### Stammlösung 50x VisiGel-TAE pH 8, Laufpuffer

242 g Tris Base

57,1 ml Eisessig

37,2 g EDTA

auf 1 l mit Aqua bidest. auffüllen, dabei pH 8 mit NaOH einstellen.

Für diese hochauflösende Gelelektrophorese wurde der Gelladepuffer Nr. III (siehe Kapitel 2.2.3.3) ohne Bromphenolblau verwendet, um im Bereich zwischen 40-80 bp liegende DNA-Fragmente nicht zu überdecken. Ergänzend zur der 1kb DNA-Leiter wurde der Größenstandard Nr. V (auf 1  $\mu\text{g}$  DNA/6  $\mu\text{l}$  verdünnt) genutzt, um den Bereich kleiner und kleinster DNA-Fragmente abzudecken. Um auch die kleineren Fragmente gut detektieren zu können, wurden die gesamten Restriktionsansätze und von den Standards 18  $\mu\text{l}$  aufgetragen.

Standard Nr. V (pBR322-DNA/Hae III, 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , Boehringer), Fragmentlängen in bp: 587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124, 123, 104, 89, 80, 64, 57, 51, 21, 18, 11, 8.

Die Gele lieferten bei 7-8 h Laufzeit und geringer Spannung (ca. 2 V/cm) eine gute Auftrennung. Um v.a. auch kleinste Fragmente im unteren Gelbereich zu detektieren, mußten die Gele danach zusätzlich 1 h in einem Ethidiumbromidfärbebad (2 mg/l l Wasser) unter leichtem Schwenken (Schüttler KL2, Edmund Bühler Laborgerätebau) nachgefärbt werden, und die Dokumentation mit dem Video-System von Cybertech unter kurzweiligem UV-Licht (254 nm, Transilluminator Model IL200-K, Bachofer) erfolgen.

## **2.2.5 Direkte Sequenzierung von PCR-Produkten**

Die Sequenzierung von PCR-Produkten wurde mit dem Kettenabbruch-Verfahren nach SANGER durchgeführt (SANGER *et al.* 1977). Für die direkte Sequenzierung der doppelsträngigen PCR-Produkte wurden entweder über eine Festphasenmethode DNA-Einzelstränge gewonnen (HULTMAN *et al.* 1991), oder es wurde ein Cycle-Sequencing-Verfahren mit *Taq* DNA-Polymerase angewandt (MURRAY 1989), bei dem man sich die Thermostabilität von *Taq* DNA-Polymerase zunutze macht und die Sequenzierreaktion analog einer PCR durchführt. Durch die Denaturierung der DNA in jedem Zyklus und die hohe Polymerisierungstemperatur wird die Ausbildung von Sekundärstrukturen, die zu unspezifischen Kettenabbrüchen führen können, vermindert. Auch können wesentlich geringere Template-

Mengen eingesetzt werden, da mit der Zykluszahl die Zahl der Polymerisationsprodukte linear vervielfältigt wird.

### 2.2.5.1 Verwendete Sequenzierprimer

Für die Sequenzierreaktionen wurden die PCR-Primer (siehe Tab.2.2.3.1-1) und interne Primer (Tab.2.2.5.1-1) verwendet. Für Sequenzierungen am ALFexpress wurden 5'-Cy5-markierte Oligonukleotide eingesetzt. Vorratslösungen oder gebrauchsfertige PCR-Primerlösungen wurden zum Sequenzieren mit 10 mM Tris-HCl pH 8 verdünnt (auf 1-2  $\mu$ M).

**Tab.2.2.5.1-1: Interne Sequenzierprimer für die 18S, ITS und 26S rDNA.** Positionsangabe nach *Saccharomyces cerevisiae* (siehe Anhang I). Richtung: forw. = forward, rev. = reverse. Referenzen: (1) 'http://www.mbl.edu/labs/Sogin/Pages/primers.html', (2) ELWOOD *et al.* (1985), (3) GUNDERSON *et al.* (1986), (4) T. FRIEDL, pers.Mitt. (z.T. in FRIEDL 1996), (5) LANE *et al.* (1985), (6) WHITE *et al.* (1990), (7) 'http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm', (8) in dieser Arbeit (s.u.). Originalnamen der Primer sind in {} angegeben.

Position	Richt.	Sequenz (5' $\Rightarrow$ 3')	Ref.
<b>18S rDNA</b>			
18S: 83-99	forw.	GAAAC TGC GA ATGGC TC	1
18S: 382-396	forw.	CGGAG AGGGA GCCTG	2 (modifiziert)
18S: 575-590	forw.	CGGTA ATTCC AGCTC C	3
18S: 896-910	forw.	YAGAG GTGAA ATTCT	2
18S: 1111-1127	forw.	GTATG GTCGC AAGGC TG	4
18S: 1263-1277	forw.	GGTGG TGCAT GGCCG	2 (als reverse)
18S: 1423-1438	forw.	CAGGT CTGTG ATGCT C	3
18S: 397-381	rev.	TCAGG CTCCC TCTCC GG	2
18S: 583-566	rev.	GWATT ACCGC GGCKG CTG	5
18S: 1438-1423	rev.	GGGCA TCACA GACCT G	3
<b>ITS rDNA</b>			
18S: 1780-1798	forw.	ACCTG CGGAA GGATC ATTG	4
5.8S: 31-50	forw.	GCATC GATGA AGAAC GCAGC	6 {ITS3}
5.8S: 36-52	forw.	GATGA AGAAC GCAGC GA	4
5.8S: 52-36	rev.	TCGCT GCGTT CTTCA TC	4
<b>26S rDNA</b>			
26S: 386-370	rev.	TTTTC AAAGT TCTTT TC	7 {LR2}
26S: 651-635	rev.	CCGTG TTTCA AGACG GG	7 {LR3}
26S: 888-870	rev.	ATCGA TTTGC ACGTC AGAA	8 {26S-870-3}
26S: 964-948	rev.	TCCTG AGGGA AACTT CG	7 {LR5}
26S: 1141-1125	rev.	CGCCA GTTCT GCTTA CC	7 {LR6}
26S: 1448-1432	rev.	TACTA CCACC AAGAT CT	7 {LR7}
26S: 1861-1845	rev.	CACCT TGGAG ACCTG CT	7 {LR8}

Bei der Sequenzierung der 26S rDNA konnten mit dem reversen Primer „LR4“ (Position 854-838, ‘<http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>’) keine Ergebnisse erzielt werden. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit ein alternativer Primer 26S-870-3’ entwickelt, der homolog zu den Positionen 888-870 ist. Dieser wurde im Vergleich konservierter Sequenzabschnitte der eukaryotischen 26S rRNA (‘<http://www.rna.icmb.utexas.edu>’) zu ersten selbst gewonnenen *Exobasidium*-Sequenzen und Datenbankeinträgen verschiedenster Eukaryoten erstellt; er ist daher nicht pilzspezifisch.

### 2.2.5.2 Manuelle DNA-Einzelstrangsequenzierung mit <sup>35</sup>S-Markierung

Hierfür wurden PCR-Produkte verwendet, bei denen einer der beiden PCR-Primer mit Biotin markiert war. Die Trennung der beiden Stränge der PCR-Produkte erfolgt durch die Anbindung des biotinylierten DNA-Stranges an Streptavidin-beschichtete, superparamagnetische Polystyrolkugeln. Diese werden in einem Magnetfeld fixiert („Festphase“), so daß der zweite DNA-Strang mit einer Denaturierungslösung entfernt werden kann. Durch anschließende Waschschrte wird saubere ssDNA als Template für die Sequenzierreaktionen gewonnen, die frei von dNTPs und anderen Bestandteilen des PCR-Reaktionsansatzes ist. Die manuelle Sequenzierung wurde mit einer T7 DNA-Polymerase durchgeführt, die Polymerisationsprodukte in Polyacrylamidgelen aufgetrennt und aufgrund einer radioaktiven Markierung mittels Autoradiogrammen detektiert. In einer Labelling-Reaktion wurde hierzu [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]-dATP hinter die Primer eingebaut.

#### Aufreinigung der PCR-Produkte über Dynabeads

Dynabeads-Waschpuffer: 0,15 M NaCl, 0,1 M Tris Base pH 7,6 (autoklaviert).

Pro Sequenzierreaktion wurden 50-100  $\mu$ l PCR-Produkt (je nach DNA-Konzentration) mit 20  $\mu$ l Dynabeads-Lösung (M-280, Streptavidin-konjugiert, Dynal - die rund 6 pmol dsDNA von 1-2 kb Größe binden) aufgereinigt.

Die Dynabeads-Lösung wurde resuspendiert und daraus die benötigte Menge in ein 1,5 ml RG gegeben (maximal 80  $\mu$ l pro RG). Die Dynabeads wurden mit 10 Vol. Waschpuffer versetzt und durch Auf- und Abpipettieren vorsichtig gewaschen. Danach wurden sie mindestens 30 s in den Magnethalter (Magnetic Particle Concentrator 1,5 ml, Dynal) gestellt. Die klaren Überstände wurden mit einer Pipette vorsichtig abgenommen, und der Waschschrte wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurden die PCR-Produkte zugegeben und wie oben vorsichtig mit den Dynabeads durch Pipettieren vermischt. Zur Bindung der DNA an die Dynabeads wurden die RG 30 min lang alle 3 s geschwenkt. Danach wurden die RG

mind. 30 s in den Magnethalter gestellt, und die Überstände wurden entfernt. Die dsDNA-beladenen Dynabeads wurden zweimal mit Waschpuffer gewaschen. Zur Denaturierung wurde 10 Vol. einer 0,15 M NaOH (frisch hergestellt) zugegeben, mit der Pipette gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die RG wurden wieder mind. 30 s in den Magnethalter gestellt, und die Überstände wurden abgenommen. Die nun mit ssDNA beladenen Dynabeads wurden noch zweimal mit Waschpuffer und einmal mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Danach wurden die Dynabeads in einem der ursprünglichen Menge an Dynabeads entsprechenden Volumen H<sub>2</sub>O aufgenommen und auf Eis gestellt.

### Sequenzierung einzelsträngiger DNA mit Sequenase

Die Sequenzierungen wurden mit „Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit“ (USB) in drei Schritten durchgeführt. Pro Reaktion wurde rund 1 µg Template-DNA benötigt. Es wurde immer auf Eis gearbeitet. Die DNA-Polymerase wurde unmittelbar zum Pipettieren aus dem Gefrierschrank entnommen.

#### 1. Annealing-Reaktion

Die Dynabeads-Lösungen wurden mind. 30 s in den Magnethalter gestellt, das Wasser wurde abpipettiert und die ssDNAs wurden in 7 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

7 µl	ssDNA
1 µl	1 µM Primer (1 pmol)
2 µl	Reaction Buffer (5x)
10 µl	Reaktionsvolumen

Die Ansätze wurden 2 min bei 65°C inkubiert (Thermoblock, Bioblock Scientific, Code 92617), anschließend über mehrere Minuten auf 37°C abgekühlt und unmittelbar danach auf Eis gestellt.

#### 2. Labeling-Reaktion

Zu jeder Annealing-Reaktion wurden folgende Komponenten zu pipettiert:

1,0 µl	DTT Solution	
2,0 µl	verdünnter GTP Labelling Mix	(0,4 µl + 1,6 µl H <sub>2</sub> O)
2,0 µl	Enzym Dilution Buffer & Enzym	(1,75 µl + 0,25 µl)
0,5 µl	[α- <sup>35</sup> S]-dATP (10 µCi/µl, DuPont)	
15,5 µl	Reaktionsvolumen	

Die Labeling-Reaktionen wurde für 2(-3) min bei RT inkubiert und wieder auf Eis gestellt.

### 3. Terminations-Reaktion

Pro Sequenzierreaktion wurden zu Beginn der Sequenzierarbeiten vier RG mit den vier Terminationslösungen vorbereitet und bei RT stehen gelassen. In je ein RG wurden 2,5  $\mu$ l ddATP, ddCTP, ddGTP bzw. ddTTP gegeben und in einem Heizblock auf 37°C vorgewärmt. Von den Labeling-Reaktionen wurden unter gründlichem Mischen mit der Pipette je 3,5  $\mu$ l in die vier RG mit den Terminationslösungen gegeben und 5 min bei 37°C inkubiert. In derselben Reihenfolge wurden die Terminations-Reaktionen durch Zugabe von 5  $\mu$ l Stopp-lösung beendet und auf Eis gestellt. Die Sequenzierreaktionen wurden im Anschluß entweder direkt auf Polyacrylamidgele aufgetragen oder bis zu einer Woche bei -20°C eingefroren.

### Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur optimalen Auftrennung wurden denaturierende Polyacrylamidgele mit 6% und 8% Acrylamid hergestellt. Die vertikalen Polyacrylamidgelelektrophoresen wurden mit dem Sequenzierapparat Model S2 (Gibco BRL) und dem Steuergerät ECPS 3000/150 (Pharmacia LKB) durchgeführt.

#### Stammlösung 10x TBE pH 8,3, Laufpuffer

121,1 g	Tris Base
55 g	Borsäure
7,4 g	EDTANa <sub>2</sub>
	auf 1 l mit Aqua bidest.

#### Polyacrylamidgellösungen

6%	8%	
75 ml	100 ml	40% Acrylamid/Bis-Acrylamid 19:1 (Stock Solution Mixture, Sigma)
50 ml	50 ml	10x TBE
175 ml	150 ml	H <sub>2</sub> O
250 g	250 g	Harnstoff

auf einem Magnetrührer (IKAMAG RET, IKA-Labortechnik) unter Erwärmen gut mischen. Im Dunkeln bei RT für ca. 4 Wochen haltbar.

Die Trägerplatten wurden mit unvergälltem Ethanol gesäubert. Die kürzere Platte wurde mit 3 ml Repel-Silan (Pharmacia LKB) silikonisiert und mit der beschichteten Seite nach innen auf die größere Platte gelegt, auf der sich schon 0,4 mm Side Spacer mit Moosgummis an den oberen Enden befanden. Die seitlichen oberen Enden der kurzen Platte wurden mit den Moosgummis bündig abgeschlossen und die Unterkanten der Platten durch einen Streifen Whatmann-Papier abgedichtet. Das „Gel-Sandwich“ wurde mit Foldback-Klammern seitlich und unten fixiert. 90 ml Polyacrylamidlösung wurden mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entgast, 900  $\mu$ l frisches 10%-iges APS und 15  $\mu$ l TEMED zugegeben



und vorsichtig, aber zügig vermischt. Innerhalb von maximal 10 min wurde die Lösung luftblasenfrei in die Gelform gefüllt und ein Haifischzahnkamm mit der geraden Seite nach unten ca. 6 mm tief in das Gel geschoben, der ebenfalls mit Foldback-Klammern fixiert wurde. Das Gel polymerisierte in  $\geq 1$  h horizontal liegend. Nach der Entfernung von Klammern und Kamm wurde die Gelform gründlich mit VE-Wasser gespült. Der Kamm wurde mit den Zähnen nach unten so eingesetzt, daß diese gerade die Geloberfläche berührten, ohne sie einzustechen. Die Gelform wurde in den Elektrophoreseapparat eingesetzt und die Pufferkammern mit 1x TBE befüllt.

Zum Erwärmen des Geles wurde eine Vorelektrophorese für 30 min bei 70 W (1800 V, 150 mA) durchgeführt. Die Sequenzierreaktionen wurden vor dem Auftragen 2 min bei 80-90°C denaturiert, kurz zentrifugiert (Centrifuge 5415C, Eppendorf) und wieder auf Eis gestellt. Die Taschen wurden von Rest-Harnstoff freigespült und je 3  $\mu$ l aus den Sequenzierreaktionen aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 50 W maximaler Leistung für 6 1/2 bis 7 1/2 h bei den 6%-igen Gelen bzw. 4 bis 4 1/2 h bei den 8%-igen Gelen durchgeführt.

Nach der Elektrophorese wurden die Gelformen aus dem Elektrophoreseapparat genommen und die kleine, mit Repel-Silan behandelte Platte mit Hilfe eines Spatels abgehoben. Die größere Trägerplatte mit dem Gel wurde 15 min in ein Fixierbad (10% Methanol, 10% Eisessig) gelegt. Danach wurde ein Bogen 3MM Papier (Whatman) aufgelegt. Das Gel mit dem Papier wurde von der Platte abgezogen, mit Haushaltsfolie abgedeckt und in einem Gel-trockner (Model 583 Gel Dryer, BioRad) bei 80°C für 2 h vakuumgetrocknet (Membranvakuumpumpe Typ MZ2C, Vacuubrand GmbH & Co). Auf das getrocknete Gel wurde nach Entfernen der Haushaltsfolie ein Autoradiogramm-Film (Hyperfilm- $\beta$ max, Amersham) aufgelegt. In Filmkassetten (X-ray Exposure Holder, Kodak) wurde je nach Strahlungsintensität (Strahlenmeßgerät Berthold LB 1210 B, Bachofer) bis zu fünf Tage lang belichtet. Die Filme wurden 7 min entwickelt (GBX Developer & Replenisher, Kodak), 2 min gewässert, 10 min fixiert (GBX Fixer & Replenisher, Kodak), 10 min unter fließendem Wasser und schließlich mit VE-Wasser gespült und getrocknet. Die Autoradiogramme konnten dann über einem Leuchttisch gelesen werden.

### **2.2.5.3 Cycle-Sequencing und automatische Sequenzierung am ALFexpress**

Eine Einzelstrang-Gewinnung ist für das Cycle-Sequencing-Verfahren nicht notwendig. Jedoch müssen nicht-eingebaute Primer des PCR-Ansatzes und dNTPs entfernt werden. Hierfür wurden die PCR-Produkte enzymatisch mit Exonuklease (für ssDNA) bzw. Phosphatase (für dNTPs) behandelt. Die Auftrennung der Polymerisationsprodukte erfolgt am ALFexpress Sequencer (Pharmacia Biotech) in einer Polyacrylamidgelelektrophorese. Sie werden

aufgrund der laserinduzierten Fluoreszenz der über die Sequenzierprimer eingebrachten Cy5-Markierung automatisch detektiert.

Für die enzymatische Behandlung wurden die entsprechenden Enzyme aus dem „Sequenase PCR Product Sequencing Kit“ (USB) verwendet. Für eine Sequenzierreaktion wurden 5  $\mu$ l PCR-Produkt (mit  $\geq$  200 ng DNA) aufgereinigt. Es wurden 1  $\mu$ l Exonuklease I (10 U/ $\mu$ l) und 2  $\mu$ l alkalische Phosphatase (1 U/ $\mu$ l) zugegeben und mit dem Ansatz 15 min bei 37°C inkubiert. Eine Inaktivierung erfolgte durch anschließende 15-minütige Inkubation bei 80°C. Die Proben wurden kurz zentrifugiert und auf Eis gestellt.

Die Sequenzierreaktionen wurden mit dem „Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit with 7-deaza-dGTP“ (Amersham Life Science) durchgeführt. Vier RG wurden für die Terminations-Reaktionen jeder Probe vorbereitet, indem 2  $\mu$ l einer der ddNTP-Lösungen in je ein RG gegeben wurden. Für jede Sequenzierreaktion wurde folgender Mastermix erstellt:

15 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O
5 $\mu$ l	2 $\mu$ M Primer, Cy5-markiert (10 pmol)
5 $\mu$ l	<u>gereinigtes PCR-Produkt</u>
25 $\mu$ l	

Je 6  $\mu$ l wurden in jede der vier zugehörigen Terminationslösungen gegeben. Die Ansätze wurden mit Öl überschichtet und in einem Thermocycler mit folgendem Profil sequenziert: 5 min 94°C Denaturierung und 25 Zyklen mit 45 s bei 94°C, 45 s bei 55°C und 1 min bei 72°C (Thermocycler 60, Bachofer bio-med). Danach wurden die Reaktionen mit 4  $\mu$ l des formamidhaltigen Ladepuffer versetzt. Sie konnten so direkt, ohne weitere Denaturierung, auf den ALFexpress aufgetragen oder bei -20°C eingefroren werden.

Als Polyacrylamidgel kam ein 0,5 mm dickes 5,5%-iges Long-Ranger-Acrylamidgel (FMC-Biozym) zum Einsatz, auf das 6  $\mu$ l der Terminations-Reaktionen aufgetragen wurden. Die vier Reaktionen einer Probe wurden in vier nebeneinander liegende, definierte Taschen des Gels pipettiert. Am Ende des Laufs werden die erfaßten Daten der zusammengehörigen Laufspuren einer Probe in einen einzigen Chromatogramm-Datenfile geschrieben und automatisch prozessiert. Das Prozessieren kann in der ALF-Steuerungssoftware kontrolliert und durch die Festlegung eines spezifischen Startpunktes manuell optimiert werden.

#### **2.2.5.4 Cycle-Sequencing und automatische Sequenzierung am Kapillarsequenzierer ABI 310**

Zur Aufreinigung der PCR-Produkte diente hier eine Fällung mit Polyethylenglykol. Die Detektion der Polymerisationsprodukte geschieht beim ABI PRISM 310 Genetic Analyzer

(PE Applied Biosystems) ebenfalls mit laserinduzierter Fluoreszenz. Allerdings sind hier die vier Didesoxynukleotide markiert, jedes mit einem anderen Farbstoff, weswegen eine Auftrennung in vier Terminations-Reaktionen nicht notwendig ist. Da das Detektionssystem sehr empfindlich ist, müssen nicht-eingebaute fluoreszierende ddNTPs abgetrennt werden, wozu die Polymerisationsprodukte aus der Reaktionslösung ausgefällt wurden.

Die zu sequenzierenden PCR-Produkte wurden mit H<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt und mit 1 Vol. Chloroform versetzt, auf dem Vortex kurz gemischt und 90 s zentrifugiert. Die obere, wäßrige Phase wurde abgenommen und die Chloroform-Ausschüttelung wiederholt. Zu der wäßrigen Lösung wurde 1 Vol. PEG-Lösung (20% Polyethylenglykol 8000, 2,5 M NaCl) gegeben und 15 min bis 2 h bei 37°C inkubiert. Durch 15 min Zentrifugation (15.000 rpm bei RT) wurden die Polymerisationsprodukte pelletiert. Der Überstand mit Primern und dNTPs wurde verworfen, das Pellet mit 200 µl 80%-igen Ethanol gewaschen, bei 50°C im Trockenschrank 1 h getrocknet und anschließend in 20 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Zur Kontrolle wurde eine Agarosegelelektrophorese angeschlossen.

Die Sequenzierreaktionen wurden mit dem „ABI PRISM Dye-Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit with AmpliTaq DNA Polymerase, FS“ (PE Applied Biosystems) durchgeführt:

4 µl Reaktionsmix ABI PRISM  
1 µl 1,6 µM Primer (1,6 pmol)  
5 µl H<sub>2</sub>O + gereinigtes PCR-Produkt (ca. 50 ng DNA)  
10 µl

Das Cycle-Sequencing wurde in einem GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) mit folgendem Profil ausgeführt: 10 s 96°C Denaturierung und 25 Zyklen mit 10 s bei 96°C, 5 s bei 50°C und 4 min bei 60°C. Nach dem Sequenzieren wurden die Polymerisationsprodukte durch Zugabe von 1 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,6) und 25 µl 95%-igem Ethanol 10 min bei RT ausgefällt und durch 25 min Zentrifugieren (maximale Drehzahl bei RT) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 80%-igem Ethanol gewaschen und bei 50°C getrocknet. Die Sequenzierreaktionen wurden so tiefgefroren bis zum Lauf auf dem ABI 310 aufbewahrt.

Zum Lauf auf den ABI 310 wurden die Sequenzierreaktionen in 25 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und 2 min bei 90°C denaturiert. Die Auftrennung der Polymerisationsprodukte erfolgte mit dem „Performance Optimized Polymer 6“ und „Analyzer Buffer mit EDTA“ (PE Applied Biosystems). Im Anschluß an den Lauf werden auch hier die Daten automatisch prozessiert und in einen Chromatogramm-Datenfile geschrieben, was in der ABI-Steuerungs- und Datenanalysesoftware kontrolliert und manuell durch Festlegung eines Start- und Endpunktes optimiert werden kann.

## **2.3 Datenauswertung**

### **2.3.1 Auswertung der Agarosegele**

Die Bestimmung der Größe von PCR-Produkten sowie die Analyse der Restriktionsfragmente erfolgte anhand der digitalisierten Aufnahmen von Agarosegelen mit dem Programm CAM 2.0 (CYBERTECH 1993). Notwendige Voraussetzung für die kb-Bestimmung in CAM ist die geometrische Korrektur der aufgenommenen Bilder und eventuell auch eine Kontrastverstärkung zur automatischen Bandenerkennung. Die verschiedenen Arbeitsschritte dieser computergestützten Auswertung der Gelbilder werden hier im Detail beschrieben, da sie bei verschiedenen Programmen unterschiedlich sind, aber immer kritische Aspekte in Hinblick auf die Qualität der später systematisch-phylogenetisch auszuwertenden Daten enthalten.

#### **2.3.1.1 Dokumentation der Bilder von Agarosegelen mit CAM**

Bilder von Agarosegelen wurden über das Video-Dokumentationssystem CS1 von Cybertech ausgedruckt bzw. digitalisiert gespeichert (in dem programmeigenen cbc- oder in tif-Format). Ebenso wurden die in dem Auswertungsprogramm CAM mit Funktionen wie „geometrische Korrektur“ oder mit sogenannten „Image Filtern“ weiter bearbeiteten Bilder gespeichert.

Die gespeicherten Bilder sind immer Darstellungen von hellen Banden auf dunklem Hintergrund, auch wenn in CAM zur Bearbeitung Inversdarstellung gewählt wurde. Die tif-Files wurden in Macintosh-lesbare pict-Files über einen Graphikkonverter (LEMKE 1994, 1998) umgewandelt, um in Graphikprogrammen beschriftet werden zu können. Es wurde dabei mit dem Graphikkonverter zur Verbesserung der Druckqualität eine Invertierung zu schwarzen Banden auf weißem Grund sowie eine zusätzliche Kontrastverstärkung vorgenommen. Die Darstellung schwach gefärbter Banden im Druck ist dabei immer problematisch, da zu kontrastreiche Darstellungen zu einer gegenseitigen Überstrahlung von kräftig gefärbten, im Gel nicht gut aufgetrennten Banden führt.

In CAM war zur Dokumentation bestimmter Bearbeitungsschritte nur ein Ausdruck auf Laserdrucker möglich - z.B. von Hilfslinien zur geometrischen Korrektur, Markierungen von Banden oder auch erstellter Eichkurven. Um in dieser Arbeit CAM-Bearbeitungen zu illustrieren, sind daher entweder CAM-Ausdrucke eingescannt worden oder in Graphikprogrammen Gelbilder mit entsprechenden Markierungen versehen worden.

### 2.3.1.2 Bildbearbeitung in CAM: Geometrische Korrektur

Die Genauigkeit der Bestimmung von DNA-Fragmentgrößen nach Auftrennung in Agarosegelen hängt von verschiedenen Einflüssen ab, die das Laufverhalten bzw. die Auftrennung der DNA in jedem einzelnen Gel beeinflussen. Auch kann ein ungleiches Laufverhalten innerhalb eines Geles („Smiling“) auftreten. Solche, das Laufverhalten ungleichmäßig beeinflussenden Effekte sind für Auswertungen mit CAM von entscheidender Bedeutung, da das Programm die Größenbestimmung aufgrund der absoluten Laufstrecken durchführt, die ausschließlich durch ihre Lage auf dem Bildschirm festgelegt werden. Der obere Bildrand gilt als Startlinie und die absoluten Laufstrecken der Banden werden von CAM als Abstand rechtwinklig zu dieser ermittelt. Eine Eichkurve aus den DNA-Größenstandards wird separat dazu berechnet.

Für eine genaue kb-Bestimmung in CAM ist es daher essentiell, daß die Gele exakt ausgerichtet sind, die Geltaschen als Startlinie der Elektrophorese parallel zum oberen Bildrand liegen. Schief aufgenommene Gele und Smiling-Effekte müssen vor der Größenbestimmung durch eine geometrische Korrektur des Bildes bestmöglich ausgeglichen werden. CAM kann nacheinander horizontale und vertikale Korrekturen vornehmen. Durch Anklicken mit der Maus werden Punkte gleicher Lage festgelegt, die durch eine Gerade miteinander verbunden werden. So werden mehrere Ausgleichslinien definiert, die von CAM dann parallel zu den Bildrändern ausgerichtet werden, wobei die dazwischen befindlichen Flächen bzw. Strecken entsprechend entzerrt oder gestaucht werden. Zur Festlegung solcher Ausgleichslinien sind Fixpunkte nötig, wozu sich die Banden der DNA-Größenstandards eignen. In den Gelen wurde daher der Marker mehrfach, in PCR-RFLP-Gelen mindestens dreimal, aufgetragen.

Die geometrische Korrektur ist an einem Gel mit drei Markerspuren in Abb.2.3.1.2-1 illustriert. Abb.2.3.1.2-1A zeigt die Originalaufnahme, in der durch den eingezeichneten, rechtwinkligen Rahmen die „Schieflage“ des Geles verdeutlicht wird. Zur horizontalen Korrektur wurde durch Anklicken und Verbinden der obersten Markerbanden (Abb.2.3.1.2-1B) die Parallelität der tatsächlichen Startlinie des Gellaufes zum oberen Bildrand festgelegt. Abb.2.3.1.2-1C zeigt schließlich das horizontal und vertikal geometrisch korrigierte und zusätzlich durch Image Filter (siehe folgendes Kapitel) stärker kontrastierte Bild.

### 2.3.1.3 Bildbearbeitung in CAM: Kontrastierung und Bandenerkennung

In einem wählbaren Bildausschnitt versucht CAM, alle vorhandenen Banden aufgrund von Kontrastunterschieden automatisch zu erkennen. Es kann mit Hilfe der Image Filter „Noise Reduction“, „Background Subtract“ und „Sharpening“ die Bildqualität verbessert (siehe dazu Abb.2.3.1.2-1) und so die Erkennung schwächerer oder unscharfer Banden erreicht

werden. Zusätzlich lassen sich während der Auswertung am Bildschirm nicht-speicherbare Kontrastveränderungen über die Funktionen „Automatic Contrast Enhancement“ und „Transfer“ erzielen, die u.a. eine Überhöhung von Kontrastunterschieden im Bereich geringer Intensitäten zur Verstärkung schwach gefärbter Banden ermöglichen. Neben der automatischen Bandenerkennung im „Search“-Modus können DNA-Banden auch manuell im „Set“-Modus festgelegt werden.

Analog erfolgt die automatische Erkennung und Festlegung der Banden der Markerspuren. Zuvor muß dazu eine der Markerspuren in CAM als DNA-Größenstandard („Standard“) definiert werden. Erst danach können Bildbereiche zur Bandenerkennung für die kb-Bestimmung ausgewählt werden.

#### 2.3.1.4 kb-Bestimmung in CAM

Aus den Positionen der Markerbanden und ihren bekannten Größen wird von CAM mittels eines wählbaren Interpolationsverfahrens anhand der „Standard“-Spur eine Eichkurve „Laufstrecke gegen Basenpaarzahl“ errechnet. Es wurde der für Agarose- und Polyacrylamidgele empfohlene Algorithmus „hyperbolische Regression“ benutzt. Über den Befehl „Determine Runlength: kb“ werden den übrigen DNA-Banden über diese Eichkurve bp-Werte zugeordnet. DNA-Banden, die unterhalb der kleinsten oder oberhalb der größten analysierbaren Bande des Markers liegen, werden bp-Werte über eine Extrapolation zugeordnet.

Den Banden des „Standards“ werden in CAM abgespeicherte bp-Werte der einzelnen Fragmente der DNA-Größenstandards zugeordnet. Waren in der 1kb DNA-Leiter die 506 und 517 bp Fragmente nicht aufgetrennt, wurde die resultierende Bande als 510 bp festgelegt; die aus den 1.850 und 1.900 bp Fragmenten des Standard Nr. VII resultierende Bande wurde als 1.875 bp festgelegt.

---

**Abb.2.3.1.2-1: Beispiel für geometrische Korrektur und Kontrastierung in CAM.** 26S rDNA PCR-Produkte mit dem Primerpaar LR0R/LR9. 0,8%-iges Agarosegel in 1x TAE mit langer Laufstrecke zur genauen Größenbestimmung. Bildausschnitt, gespeicherter tif-File mit nachträglich eingezeichneten Markierungen. DNA-Größenstandard (M) = 1kb DNA-Leiter, Stammnummern angegeben, \* = Bande „falscher“ Größe (PCR-Artefakt). **A.** Originalbild, inverse Darstellung: Rahmen zur Verdeutlichung der notwendigen Korrekturen. **B.** Originalbild, inverse Darstellung: Ausgleichslinien für die horizontale Korrektur. **C.** Bild nach horizontaler und vertikaler geometrischer Korrektur sowie Kontrastierung: Rahmen zur Verdeutlichung der erfolgten Korrekturen.

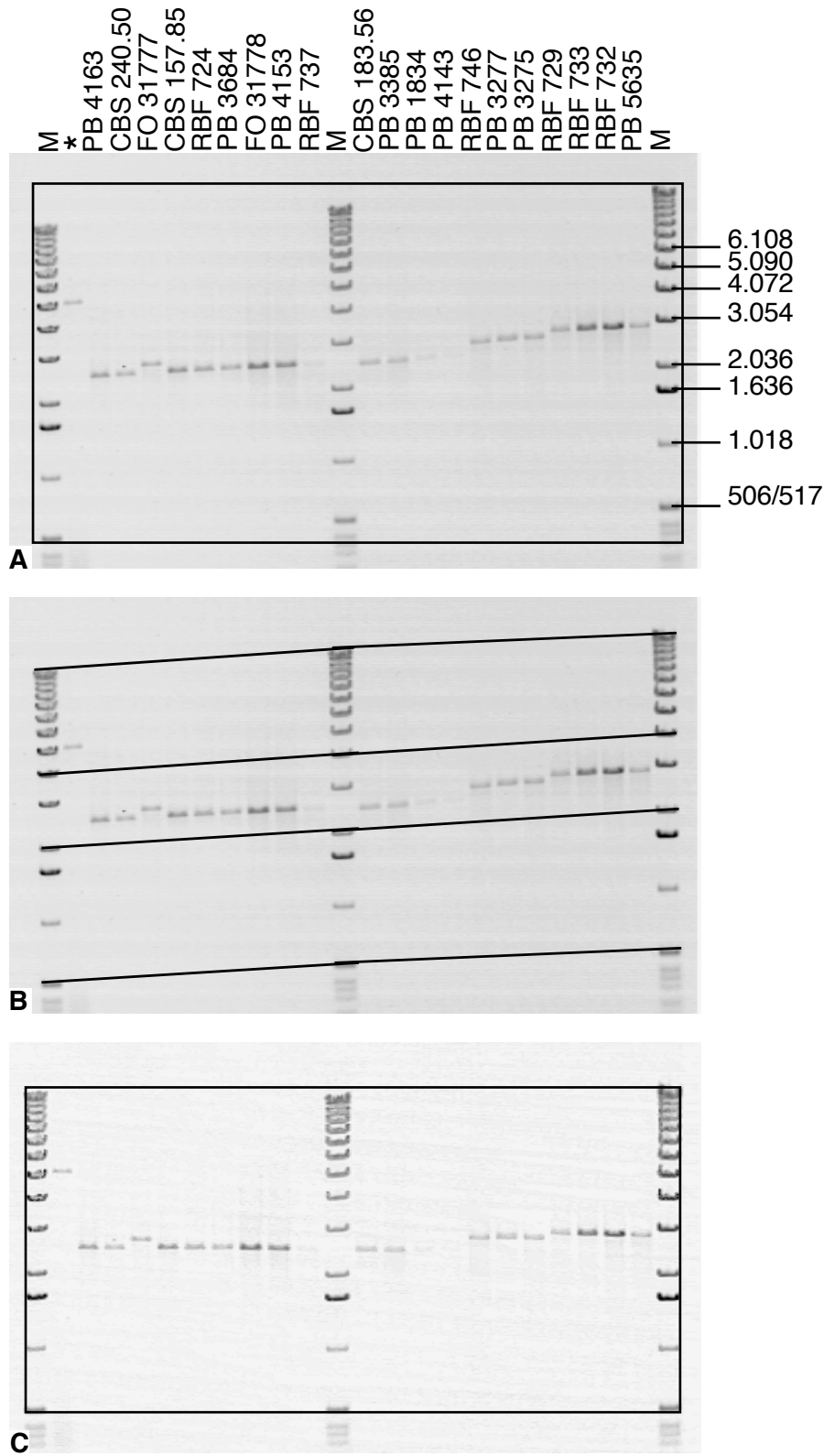
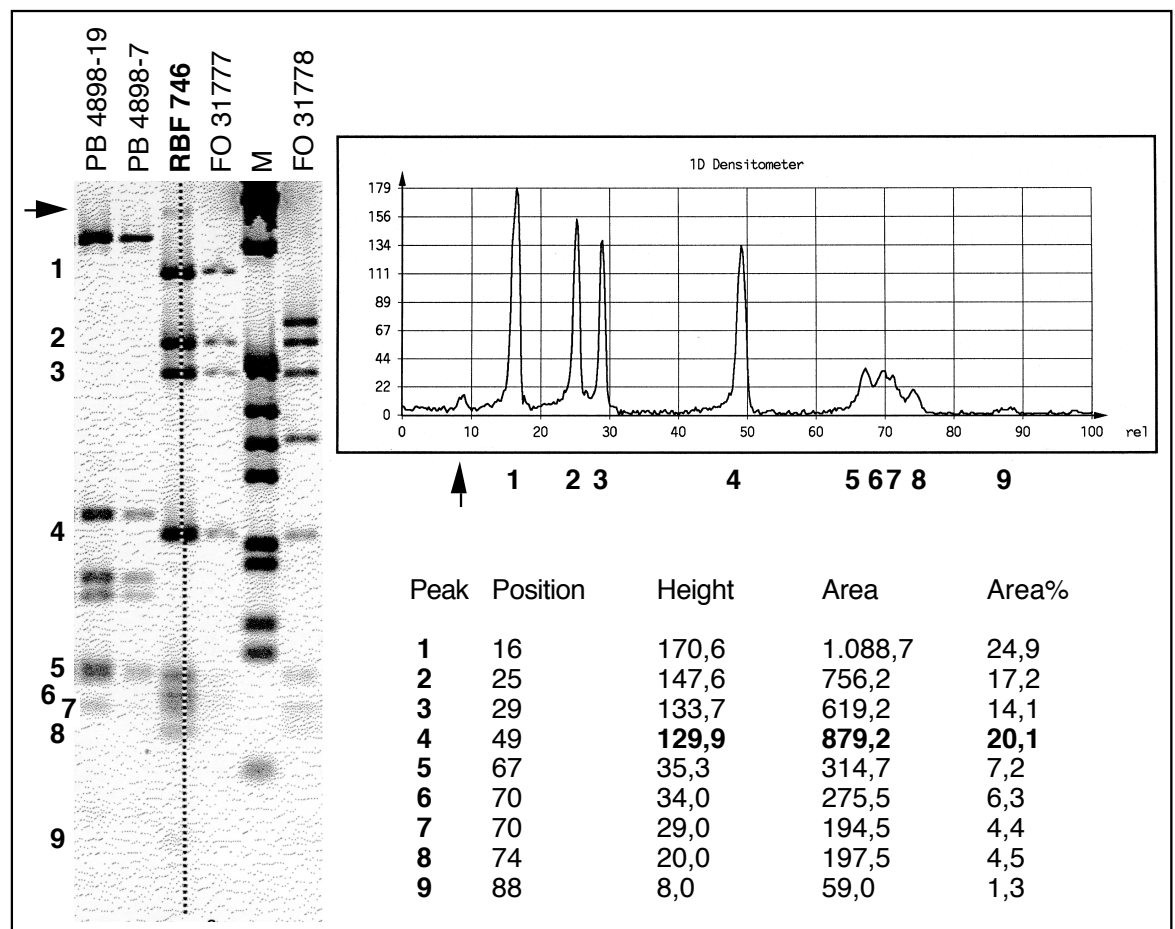


Abb.2.3.1.2-1

### 2.3.1.5 Densitometrische Analyse in CAM

Zusätzlich zu den Bestimmungen der Fragmentgrößen wurden bei der Analyse der PCR-RFLP-Gele noch 1D-Analysen, eindimensionale densitometrische Auswertungen mit CAM durchgeführt („1D-Densitometer“). Diese Auswertungen dienen einerseits dazu, eine äquimolare Verteilung der DNA-Mengen zu überprüfen. Da bei der Spaltung eines linearen DNA-Stückes alle Fragmente in gleicher Anzahl (gleicher Molarität) entstehen müssen, ergibt eine nicht äquimolare Verteilung von DNA-Mengen in den Bandenmustern einen Hinweis auf nicht getrennt laufende Fragmente („Mehrfachbanden“).



**Abb.2.3.1.5-1: Beispiel für ein densitometrisches Profil in CAM.** Teil des gescannten Originalausdruckes eines Gelbildes mit „Densitometerlinie“ und nachträglicher Beschriftung. Restriktionsfragmente mit *Hae* III, die Stammnummern sind angegeben. DNA-Größenstandard (M) = 1kb DNA-Leiter: Fragmente von 75 bp bis 1.018 bp aufgetrennt. Die Tabelle zeigt die Werte für den analysierten Stamm RBF 746. Im Profil sind neun Banden als Peaks erkennbar, die z.T. ineinander übergehen (5-8). Peak 4 besteht aus zwei Fragmenten (eine Doppelbande). Peak 9 kann in der kb-Bestimmung nur bei entsprechender Kontrasteinstellung automatisch erkannt werden. → = nicht hydrolysiertes Rest des PCR-Produktes.



Abb.2.3.1.5-1 zeigt ein densitometrisches Profil mit dem Rest eines nicht vollständig hydrolysierten PCR-Produktes und einer solchen Mehrfachbande. Bei deutlich kleinerer Fragmentgröße erreicht der Peak von Bande 4 dieselbe Höhe und Fläche wie derjenige des größeren Fragmentes der Bande 3. Darüber hinaus sind mit Hilfe der 1D-Analyse auch kleinste, nur sehr schwach fluoreszierende Banden in ihrer Lage genau definierbar.

### **2.3.2 Bestimmung der PCR-RFLP-Muster und Erstellung einer binären Matrix**

Die Auswertung der PCR-RFLP-Muster erfolgte zunächst pro PCR-RFLP-Gel einzeln. Dabei wurden alle auftretenden Fragmente über die 1D-Analyse und kb-Bestimmung charakterisiert. Das RFLP-Muster jedes PCR-Produktes (= Stammes bzw. Probe) wurde ermittelt und mit einer Berechnung der Summen der Fragmentlängen überprüft. Schließlich wurde bestimmt, bei welchen PCR-Produkten die Hydrolysen identische RFLP-Muster zeigten. Aus diesen Daten wurde pro Gelbild eine 0/1-Matrix erstellt, in der das Vorhandensein eines spezifischen Fragmentes mit „1“ und das Fehlen mit „0“ kodiert wurde. So resultierte eine Rechteckmatrix, in der die Spalten den Laufspuren, d.h. den einzelnen PCR-Produkten, entsprechen und die Reihen als Merkmale allen in dem Gel auftretenden Banden („Fragment ja/Fragment nein“).

Als nächster Schritt wurden die Matrizen der verschiedenen PCR-RFLP-Gele ein und desselben Enzyms in einer Matrix vereinigt. Dazu mußten bei nicht in allen Gelen vorhandenen Fragmenten in die Matrizen der Gele, in denen sie fehlten, statt dessen Reihen mit „0“-Werten eingefügt werden. Das Gleichsetzen (= Homologisieren) von Fragmenten und die Identifizierung von identischen RFLP-Mustern zwischen verschiedenen Gelen orientierten sich außer an den mit CAM berechneten Fragmentgrößen und einem visuellen Vergleich mit den Markerspuren möglichst an den Fragmenten der PCR-Produkte von Stamm RBF 729 oder PB 1834, die als interne Standards auf den verschiedenen Gelen aufgetragen worden waren. Für viele Fragmente unterschiedlicher RFLP-Muster auf verschiedenen Gelen ermöglichte allein der direkte Vergleich mit den Fragmenten dieser internen Standards oder mit Fragmenten von PCR-Produkten verschiedener Stämme mit identischen RFLP-Mustern auf den zu vergleichenden Gelen eine Korrektur. Bei Fragmenten, die so nicht direkt zwischen Gelen verglichen werden konnten, mußte ausschließlich ihre relative Lage im Verhältnis zu Fragmenten der Markerspuren bzw. ihre mit CAM bestimmte Größe genutzt werden. Die Homologisierung solcher „singulärer“ Fragmente zwischen mehreren Gelen wurde immer mit einer genaueren Überprüfung der Auswertung der entsprechenden Gelbilder verbunden. Zur Absicherung der Daten wurden schließlich sehr ähnliche RFLP-Muster in verschiedenen Gelen, die sich nur in der Lage von ein oder zwei Banden unterschieden, nochmals überprüft.

Nachdem für alle sechs Enzyme unabhängig voneinander die PCR-Produkte mit jeweils identischen RFLP-Mustern bestimmt worden waren, wurde eine abschließende Kontrolle der Auswertungen durchgeführt. Es wurden gezielt die RFLP-Muster der PCR-Produkte überprüft, die bei einem oder mehreren, aber eben nicht bei allen sechs Enzymen identische RFLP-Muster aufwiesen. Besonderes Augenmerk wurde schließlich auch noch auf solche PCR-Produkte gelegt, die bei verschiedenen Enzymen mit jeweils unterschiedlichen Stämmen identische RFLP-Muster aufwiesen.

Abschließend wurde eine 0/1-Matrix über alle sechs verwendeten Enzyme erstellt, indem die Matrizen der einzelnen Enzyme fortlaufend untereinander angeordnet wurden. Diese Gesamtmatrix wurde dann so gekürzt, daß PCR-Produkte (= Stämme) mit identischen RFLP-Mustern über alle sechs Enzyme genau einmal repräsentiert waren.

### 2.3.3 Sequenzanalysen

#### 2.3.3.1 Gewinnung und Korrektur der Rohdaten

Die Autoradiogramme der manuellen Sequenzierreaktionen wurden unabhängig voneinander zweimal gelesen, miteinander verglichen und die Sequenzen am Computer als Textfiles eingegeben. Die am ALFexpress gewonnen Rohdaten und automatisch prozessierten Chromatogramm-Files einzelner Sequenzierreaktionen wurden in dem Programm AM 3.01 (PHARMACIA BIOTECH 1995) kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert. Die Chromatogramme wurden ausgedruckt und die Sequenzen als Textfiles exportiert. Die Sequenzen überlappenden und gegenläufiger Reaktionen eines PCR-Produktes wurden im Editor von OLSEN (1990) oder im Sequence Navigator (APPLIED BIOSYSTEMS 1994) miteinander aligniert und auftretende Differenzen anhand der Autoradiogramme bzw. Chromatogramm-Ausdrucke geklärt. Die am ABI 310 gewonnen Chromatogramm-Files der Sequenzierreaktionen eines PCR-Produktes konnten direkt in den Sequence Navigator geladen und dort manuell editiert werden. Nachdem jede Reaktion zunächst einzeln kontrolliert wurde, wurden auftretende Differenzen zwischen alignierten Sequenzreaktionen eines PCR-Produktes direkt in den Chromatogramm-Files geklärt. Die PCR-Produkte wurden i.d.R. doppelsträngig sequenziert. Als abschließende Kontrolle wurden die Sequenzen der *Exobasidium*-Stämme untereinander aligniert und auffällige Unterschiede, wie einzelne Insertionen und Deletionen, in den Originaldaten verifiziert. Die PCR-Primersequenzen an den Enden der Sequenzen vollständig sequenzierter PCR-Produkte wurden von den folgenden Analysen ausgeschlossen.

Die 26S rDNA-Partialsequenzen folgender Stämme entstanden im Rahmen der Diplomarbeit von E. STEVANEZ (1998, Betreuer: Prof. Dr. P. BLANZ): FO 31767, FO 31777,

PB 383, PB 3276, PB 3277, PB 4143, PB 4380, PB 4898-9, PB 4898-18, PB 5634, RBF 724, RBF 727, RBF 763, RBF 765.

### 2.3.3.2 Datenbankvergleiche

Zum Vergleich und zur Bewertung eigener Sequenzdaten wurde in GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mit dem Programm BLAST nach nächst ähnlichen Sequenzeinträgen gesucht, zuletzt mit BLAST N 2.2.3 bzw. 2.2.6 (ALTSCHUL *et al.* 1997). Der „Taxonomy Browser“ in GENBANK wurde zur gezielten Datenbankrecherche nach Vergleichssequenzen für die phylogenetischen Analysen verwendet.

### 2.3.3.3 Paarweise Sequenzvergleiche

Sequenzvergleiche zur Darstellung der Ähnlichkeiten zwischen zwei Sequenzen wurden mit „Compare“ und „DotPlot“ im GCG Programmpaket (GCG 1993, 1994) durchgeführt. Hierbei wurden die Parameter „window size“ und „stringency“ variiert. „window size“ legt die Größe des Sequenzabschnittes fest, der für jeden Vergleichspunkt analysiert wird, und „stringency“ das Maß an Übereinstimmung, das für eine positive Wertung vorausgesetzt wird. Es werden so alle möglichen Sequenzabschnitte der ersten Sequenz mit allen möglichen der zweiten Sequenz verglichen und die Ergebnisse als Plot dargestellt. Insbesondere repetitive Sequenzmotive und auch größere Insertionen bzw. Deletionen sind hier gut zu lokalisieren.

### 2.3.3.4 Alignments

Sequenzalignments wurden 1.) manuell im Olsen-Editor (OLSEN 1990) erstellt, 2.) durch paarweise Vergleiche mit einer Mastersequenz in MacClade 4.03 (MADDISON & MADDISON 2001) erzeugt und dann manuell optimiert oder 3.) automatisch als multiple Alignments mit „PileUp“ im GCG Programmpaket (GCG 1993, 1994) erstellt, wobei die Parameter „gap creation penalty“ und „gap extension penalty“ variiert wurden. Zur manuellen Optimierung wurden neben automatisch in „PileUp“ erstellten Alignments auch Alignments anderer Pilze sowie bei kodierenden rDNA-Bereichen entsprechende Sekundärstrukturmodelle aus Datenbanken (<http://rdp.cme.msu.edu/html>, <http://www.rna.icmb.utexas.edu>) vergleichend hinzugezogen. Es wurde darauf geachtet, möglichst wenige Gaps und damit möglichst wenige zusätzliche Alignmentpositionen in die Matrix einzufügen. Einfache Distanzanalysen für erste Sequenzvergleiche wurden in PHYLIP 3.5c (FELSENSTEIN 1993) mit den Programmen „DnaDist“ und „Neighbor“ getätigt. Zum Vergleich von mit verschiedenen Gap-Parametern

erstellten, automatischen Alignments wurde „PlotSimilarity“ im GCG Programmpaket (GCG 1993, 1994) verwendet, welches die Gesamtähnlichkeit alignierter Sequenzen graphisch darstellt. Mit dem Parameter „window size“ wurde die Größe des Abschnittes variiert, innerhalb dessen das Maß an Übereinstimmung zwischen den Sequenzen ermittelt wird.

## 2.3.4 Dendrogramme und phylogenetische Analysen

### 2.3.4.1 Grundlagen und Hintergründe der verwendeten Verfahren

Mit den größeren molekularen Datensätzen, die in jüngster Zeit nicht nur für systematische Zwecke sondern beispielsweise auch im Zuge der Genomforschung erhoben werden, gehen beständig Verbesserungen und Neuentwicklungen von Verfahren und Algorithmen für Ähnlichkeitsvergleiche und phylogenetische Berechnungen einher. Ein eindrucksvolles Beispiel hierfür ist die erfolgreiche Umsetzung von Prinzipien der Bayes'schen Statistik für solche Zwecke (MALAKOFF 1999, HUELSENBECK *et al.* 2000, LEWIS 2001). So steht eine Vielzahl an unterschiedlichen Analyseverfahren und Computerprogrammen für die Stammbaumrekonstruktion zur Verfügung. Die gewählten Methoden sind aber nicht nur von entscheidender Bedeutung für die Umsetzung der Datensätze in Dendrogramme und damit zur Bildung phylogenetischer Hypothesen, sondern auch für die Interpretation der erzielten Ergebnisse. Daher werden im folgenden die Hintergründe der Verfahren erläutert, die in dieser Arbeit zur phylogenetischen Interpretation der erhobenen RFLP- und Sequenzdaten eingesetzt wurden. Allgemeine Grundlagen der phylogenetischen Auswertung molekularer Daten sind bei SWOFFORD & OLSEN (1990), HILLIS *et al.* (1993), SWOFFORD *et al.* (1996), PAGE & HOLMES (1998) oder auch WÄGELE (2001) ausführlich dargestellt. Ausführungen zu Clusteranalyse und Koeffizienten finden sich bei SNEATH & SOKAL (1973), der Parsimony-Analyse bei KITCHING *et al.* (1998) und der Bayes'schen Analyse bei HALL (2001).

Für die phylogenetischen Analysen wurden folgende Programme verwendet: NTSYS-pc 1.80 (ROHLF 1993), PAUP 3.1.1 (SWOFFORD 1993), PAUP\* Version 4.0b2 bzw. 4.0b10 (SWOFFORD 1999, 2002) sowie MrBayes 2.01 (HUELSENBECK & RONQUIST 2001b).

Merkmale mit diskreten Merkmalszuständen, wie sie in einem Sequenzalignment oder einer 0/1-Matrix gegeben sind, können entweder direkt zur Berechnung von Dendrogrammen verwendet werden, oder sie werden über paarweise Vergleiche zwischen allen enthaltenen Taxa mit Hilfe spezifischer Koeffizienten zunächst in Distanzmatrizen umgewandelt. Bei der direkten Nutzung diskreter Merkmalsmatrizen kommen Optimalitätskriterien zum Einsatz, welche die Auswahl der am besten zu den Daten passenden Dendrogramme unter allen möglichen Dendrogrammen erlauben (z.B. Parsimony- oder Maximum Likelihood-Verfahren).

An die Berechnung von Distanzmatrizen hingegen muß sich noch ein Verfahren anschließen, das aus der Distanzmatrix ein Dendrogramm erstellt. Auch hier gibt es einerseits Optimalitätskriterien, um am besten zu den Distanzmatrizen passende Dendrogramme auszuwählen (z.B. Fitch-Margoliash), andererseits kann aus den Distanzdaten mit Hilfe eindeutiger Algorithmen von Clusterverfahren ein Dendrogramm errechnet werden (z.B. UPGMA, Neighbor-Joining).

### **Distanzkoeffizienten und Clusterverfahren**

Distanzkoeffizienten müssen spezifisch für die jeweiligen Daten ausgewählt werden. Für die Berechnung der Ähnlichkeiten von Restriktionsfragmentmustern wurde von NEI & LI (1979) folgender Koeffizient abgeleitet:  $2n_{xy}/(n_x+n_y)$ . Die Anzahl der gemeinsam auftretenden Fragmente wird - doppelt gewichtet - in Bezug zur Summe aller Fragmente gesetzt, die in beiden Taxa vorkommen, womit die Ähnlichkeiten unabhängig von den übrigen in der Matrix vorhandenen Taxa berechnet werden. Zur Auswertung von Sequenzdaten existiert eine Fülle von Distanzkoeffizienten für paarweise Vergleiche, die auf unterschiedlich komplexen Evolutionsmodellen beruhen und damit verschiedene Aspekte molekularer Evolution berücksichtigen (siehe SWOFFORD *et al.* 1996 S.434 (Abbildung) und S.453ff, PAGE & HOLMES 1998 S.144ff). In den Auswertungen hier wurden verschiedene Distanzkoeffizienten getestet - von dem einfachsten Modell mit gleichen Häufigkeiten für alle vier Basen und einem einheitlichen Substitutionstyp (Jukes/Cantor-Modell) bis hin zu dem komplexesten Modell mit ungleichen Basenhäufigkeiten und unterschiedlichen Substitutionsraten für alle sechs möglichen Basenübergänge (GTR-Modell, general time-reversible).

Für Distanzmatrizen stehen unterschiedliche Clusterverfahren zur Verfügung. Innerhalb der SAHN-Clustermethoden („sequential, agglomerative, hierarchic, nonoverlapping clustering methods“) haben in der Auswertung phylogenetischer Daten die Average Linkage-Verfahren eine weite Verbreitung gewonnen, bei denen die Distanzen eines gebildeten Clusters zu den übrigen Elementen der Matrix als Mittelwerte aus den Distanzwerten der in das Cluster eingegangenen Taxa errechnet werden. In der Systematik hat das UPGMA-Verfahren („unweighted pair-group method using arithmetic averages“ SOKAL & MICHENER 1958) bei der Auswertung von Distanzmatrizen molekularer Daten, v.a. bei RFLP-Daten, verbreitet Anwendung gefunden. Hier werden bei jedem Clusterschritt zwei Taxa bzw. schon bestehende Cluster zusammengeführt; es können nicht mehrere Taxa gleichzeitig vereinigt werden. Auch geht in jedem Clusterschritt immer wieder die Zahl aller in einem gerade gebildeten Cluster enthaltenen Taxa in die Berechnung der Distanzen dieses neu gebildeten Clusters im Vergleich zu anderen Elementen der Matrix ein; die zusammengeführten Gruppen werden nicht zwangsläufig gleich gewichtet. UPGMA-Dendrogramme sind aufgrund des Algorithmus immer gewurzelt - der Ähnlichkeitswert von 0% ist der theoretische Ursprung des Dendro-

grammes. Es handelt sich um ultrametrische Bäume mit additiven Astlängen, bei denen die Distanz zwischen zwei Taxa durch die Lage des verbindenden Knotenpunktes angegeben wird.

Als alternative Clustermethode hat sich bei der Auswertung von Sequenzdaten das später vorgestellte Neighbor-Joining-Verfahren (SAITOU & NEI 1987) durchgesetzt. In diesem Verfahren wird für die Bildung eines Clusters nicht direkt in der Distanzmatrix nach dem Paar ähnlichster Taxa gesucht, sondern es wird das Paar ermittelt, dessen Vereinigung die Summe aller Astlängen im Dendrogramm am geringsten hält. Auch Neighbor-Joining ist ein hierarchischer Clusteralgorithmus, bei dem immer paarweise gruppiert wird. Er führt jedoch zu einem ungewurzelten Netzwerk, das nur nachträglich gewurzelt werden kann - entweder über die Festlegung von Außengruppen-Taxa oder aber in der Mitte der Strecke zwischen den Taxa mit der größten Distanz innerhalb des Dendrogrammes (Midpoint Rooting). Die Astlängen sind auch hier additiv, aber es sind keine ultrametrischen Bäume, d.h. die terminalen Äste eines Clusters können ungleich lang sein, und die Distanzen zwischen zwei Taxa werden durch die Summe der horizontalen Längen sämtlicher verbindender Äste wiedergegeben.

Clusterverfahren führen nicht immer zu eindeutigen Bäumen, da in der Distanzmatrix selbst oder aber bei jedem Schritt des Clusteralgorithmus uneindeutige Situationen (sogenannte „ties“) entstehen können, wenn mehr als ein Paar gleich ähnlicher Taxa bzw. gleich naher Nachbarn vorhanden ist. Zwar können sich die aus unterschiedlichen Clusterwegen ergebenden Topologien durchaus als identisch erweisen, aber es können auch mehrere voneinander verschiedene Dendrogramme die Distanzmatrix gleichwertig widerspiegeln. Zur Beurteilung der Qualität von Dendrogrammen aus Clusteranalysen wie UPGMA dient die kophenetische Matrix (SOKAL & ROHLF 1962). Dabei werden die Distanzen zwischen allen Taxa aus dem Dendrogramm heraus als kophenetische Werte in eine Matrix geschrieben. Ein Vergleich der ursprünglichen Distanzmatrix mit einer solchen kophenetischen Matrix zeigt, wie gut das Dendrogramm die der Analyse zugrundeliegende Matrix wiedergibt („goodness of fit“). Zur Quantifizierung wird als Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient die kophenetische Korrelation (der r-Wert) ermittelt. UPGMA-Dendrogramme zeigen im Vergleich zu anderen SAHN-Clusterverfahren häufig eine Maximierung des r-Wertes (FARRIS 1969a).

### **Parsimony**

„Evolutionary Parsimony“ wurde 1965 von CAMIN & SOKAL als Verfahren zur Erstellung von Dendrogrammen eingeführt. Das Finden des „sparsamsten“ („most parsimonious“) Baumes, der den Datensatz mit möglichst wenigen Merkmalsänderungen erklärt, wurde zum Optimalitätskriterium kladistischer Analysen. Die Merkmalsänderungen entlang der Äste

eines Dendrogrammes geben als sogenannte „Schritte“ die Astlängen und damit die phylogenetischen Distanzen zwischen den Taxa an. Seitdem entwickelte Parsimony-Ansätze unterscheiden sich vor allem in der Art des Merkmalstyps, der die Übergangsmöglichkeiten zwischen verschiedenen Merkmalszuständen beschreibt. Es gibt zwei Typen ungerichteter Merkmale, bei welchen zwischen zwei Merkmalszuständen der Übergang in beide Richtungen gleich gut möglich ist: Merkmalstyp „ordered“ mit definierten Übergangsreihenfolgen zwischen verschiedenen Zuständen (Wagner-Parsimony - KLUGE & FARRIS 1969, FARRIS 1970) und Merkmalstyp „unordered“, wo jeder Zustand direkt in jeden anderen übergehen kann (Fitch-Parsimony - FITCH 1971). Für binäre Merkmale, wie sie die 0/1-Matrizen enthalten, sind beide praktisch gleichbedeutend, nicht aber bei Merkmalen mit mehreren Merkmalszuständen wie bei Sequenzdaten. Auch können Merkmale gerichtet bzw. polarisiert sein, d.h. der Übergang zwischen Merkmalszuständen ist entweder nur in eine Richtung möglich oder ein abgeleiteter Merkmalszustand kann nur ein einziges Mal erreicht werden („irreversible“ bzw. „Dollo-Parsimony“ CAMIN & SOKAL 1965, FARRIS 1977). Darüber hinaus können individuelle Merkmalstypen definiert werden, die ungleiche Schrittlängen für die Übergänge zwischen verschiedenen Zuständen oder in Abhängigkeit von der Übergangsrichtung aufweisen. Hierzu müssen die entsprechenden Schrittlängen für alle Übergangsmöglichkeiten zwischen allen auftretenden Merkmalszuständen in einer speziellen Schrittmatrix festgesetzt werden. In dieser Arbeit werden die RFLP-Daten mit einer solchen selbst definierten Schrittmatrix verrechnet und die Sequenzdaten nach Fitch-Parsimony.

Bei Verfahren mit einem Optimalitätskriterium ist es theoretisch notwendig alle möglichen Baumtopologien zu vergleichen, um das oder die optimalen Dendrogramme zu finden. Eine solche umfassende Suche („exhaustive search“) ist bei einer größerer Zahl an Taxa auch heute computertechnisch aufwendig. Alternativ kommen daher heuristische Suchverfahren zur Anwendung, die mit unterschiedlichen Strategien versuchen die optimalen Lösungen zu finden. Für einen gegebenen Datensatz muß dabei nicht nur eine optimale Baumtopologie existieren; es können verschiedene Topologien die Merkmalsverteilung mit gleicher Gesamtschrittlänge wiedergeben. Parsimony-Verfahren resultieren i.d.R. in ungewurzelten Netzwerken. Eine Wurzelung kann zur graphischen Darstellung über die Festlegung von Außengruppen-Taxa oder über Midpoint Rooting nachträglich erfolgen. Hat die Position der Wurzel aber einen Einfluß auf die Berechnung der Schrittlängen, wie dies z.B. bei benutzerdefinierten, asymmetrischen Schrittmatrizen der Fall ist, so muß die Wurzel zuvor festgelegt werden, oder sie wird gleichzeitig mit der Suche nach dem sparsamsten Dendrogramm ermittelt, womit sogar eine Wurzelung über Außengruppen-Taxa ausgeschlossen sein kann.

Im Gegensatz zu einer paarweisen Distanzberechnung erfolgt bei Parsimony-Verfahren eine Bewertung der Merkmale immer im Kontext aller Taxa. Wagner- und Fitch-Parsimony beruhen nur auf einer Analyse der parsimony-informativen Merkmale, bei denen

mindestens zweimal zwei Taxa je einen Merkmalszustand aufweisen, so daß Gruppenbildungen möglich sind. Variable, aber parsimony-uninformative Merkmale, bei denen eine spezifische von der Mehrheit abweichende Merkmalsausprägung immer nur bei einem einzigen Taxon auftritt, sind dabei ohne Belang. Wenn jedoch auch ein einziger Merkmalsübergang je nach Position der Wurzel unterschiedliche „Kosten“ verursachen kann, wie z.B. bei asymmetrischen Schrittmatrizen, so werden alle variablen Merkmale verrechnet. Für jedes einzelne parsimony-informative Merkmal läßt sich berechnen, wie gut es nach Parsimony-Kriterien in der Topologie des über alle Merkmale gesehen sparsamsten Baumes wiedergegeben ist. Über die Werte aller einzelnen Merkmale läßt sich der gesamte Baum charakterisieren. Es finden verschiedene Indizes Anwendung, um Homoplasie-Effekte (Parallelismen, Konvergenzen oder Rückmutationen) in den Dendrogrammen zu quantifizieren, die sich in der nicht-sparsamsten Verteilung einzelner Merkmale widerspiegeln. Der Consistency-Index (CI) sowie der rescaled Consistency-Index (RC) geben an, welcher Anteil der einzelnen Merkmale sparsamst an einem Baum verteilt ist (KLUGE & FARRIS 1969, FARRIS 1989b), während der Homoplasy-Index (HI) umgekehrt angibt, zu welchem Anteil Merkmale nicht-sparsamst verteilt sind ( $HI = 1 - CI$ ). Der Retention-Index (RI) hingegen berücksichtigt nicht nur Homoplasie-Effekte, sondern zugleich in welchem Maß gleiche Merkmalszustände auch zusammen gruppiert werden, also als Synapomorphien auftreten (FARRIS 1989a, 1989b). In Anlehnung an FARRIS, der die Gewichtung von Merkmalen nach ihren Consistency-Indizes im Rahmen kladistischer Analysen einführte (1969b „successive weighting“), wurden solche Verfahren von CARPENTER (1988) vorgeschlagen, um aus mehreren gleich sparsamsten Dendrogrammen eine Topologie auszuwählen. Hierbei wird jedes Merkmal im Anschluß an die Analyse gemäß seinem Indexwert gewichtet, mit der geänderten Matrix eine neue Analyse durchgeführt, und dies solange wiederholt bis möglichst wenige oder nur ein einziges Dendrogramm resultieren. Aus den gleich sparsamsten Dendrogrammen der ursprünglichen Analyse kann als optimale Lösung dasjenige ausgewählt werden, dessen Topologie derjenigen des sukzessiven Gewichtungsverfahrens entspricht, das mit verschiedenen Indizes durchgeführt werden kann.

### **Statistische Absicherung: Bootstrap und Jackknife**

Bei der Auswertung molekularer Daten dienen als statistische Verfahren zur Bewertung der Wahrscheinlichkeit von in spezifischen Dendrogrammen auftretenden Gruppen bzw. Ästen häufig Resampling-Methoden wie Bootstrap und Jackknife (FELSENSTEIN 1988 S.548-53, SWOFFORD *et al.* 1996 S.507-09). Hierbei werden unabhängig voneinander aus dem Originaldatensatz zufällig modifizierte Datensätze gewonnen, aus denen wiederum Dendrogramme erstellt werden. Die Häufigkeit des Auftretens einer Gruppe in einem Majority-Consensus-Dendrogramm wird als Wahrscheinlichkeits- (Unterstützungs-)wert für diese Gruppe bzw. diesen Ast gewertet. Bei Bootstrap-Tests werden Stichproben mit Zurücklegen gezogen, so



daß einzelne der Merkmale fehlen und andere entsprechend mehrfach enthalten sind, während bei Jackknifing-Verfahren Stichproben verminderter Größe ohne Zurücklegen gezogen werden, so daß darin nur ein Teil der Merkmale vertreten ist.

### **Likelihood-Verfahren und Bayes'sche Statistik**

Wie bei Parsimony-Verfahren werden auch bei Likelihood-Verfahren Optimalitätskriterien zur Stammbaumrekonstruktion genutzt und die Merkmale direkt für die Auswahl des am besten passenden Dendrogrammes verwendet. Für Sequenzdaten wurde ein praktikables Maximum Likelihood-Verfahren erstmals 1981 (FELSENSTEIN) umgesetzt. Für einen gegebenen Datensatz wird unter allen möglichen Dendrogrammen dasjenige gesucht, dessen Wahrscheinlichkeit (Likelihood) am größten ist. Bei diesen sehr rechenaufwendigen Verfahren kommen meist heuristische Suchstrategien zum Einsatz. Für spezifische Topologien wird ermittelt wie wahrscheinlich es bei einem gewählten Evolutionsmodell ist, die Verteilung jedes einzelnen Merkmals des Datensatzes so zu beobachten. Die Werte aller Einzelmerkmale werden summiert und logarithmisch als Likelihood-Wert des Dendrogrammes angegeben.

In jüngster Zeit wurden Likelihood-Verfahren mit Bayes'scher Statistik zur Stammbaumrekonstruktion populär (siehe LEWIS 2001, HUELSENBECK *et al.* 2002). Während Maximum Likelihood-Verfahren spezifisch an ein auszuwählendes Evolutionsmodell gekoppelt sind, sind Bayes'sche Ansätze davon weniger abhängig. Zwar müssen auch hierbei Ausgangsparameter festgelegt werden, die ein Evolutionsmodell und einen meist zufällig ausgewählten Baum beschreiben, aber im Verlauf der Bayes'schen Analyse werden nicht nur die Baumtopologien sondern gleichzeitig auch die Parameter des Evolutionsmodells variiert. Bei jedem Schritt der Analyse wird der Likelihood-Wert des jeweiligen Baumes berechnet und vergleichend bewertet.

Bayes'sche Statistik beruht auf der Berechnung sogenannter „nachträglicher Wahrscheinlichkeiten“ („posterior probabilities“), wobei die Wahrscheinlichkeit einer ursprünglichen Annahme („prior believes“) aufgrund der erhobenen Daten korrigiert wird. Diese Berechnung erfordert die Kenntnis der Wahrscheinlichkeiten aller theoretisch möglichen Hypothesen. Bei phylogenetische Fragestellungen wären dies die Wahrscheinlichkeiten aller möglichen Baumtopologien mit allen möglichen Kombinationen an Astlängen unter allen möglichen Evolutionsmodellen. Dies ist unmöglich, und Bayes'sche Ansätze wurden als alternative Likelihood-Verfahren für Stammbaumrekonstruktionen erst mit der Nutzung von Markov Chain Monte Carlo-Verfahren anwendbar, die das Problem durch Sampling-Verfahren umgehen (RANNALA & YANG 1996, YANG & RANNALA 1997, MAU *et al.* 1999). Ausgehend von einem gewählten Anfangszustand wird bei jeder Generation einer Markov-Kette eine neue Baumtopologie bzw. ein geänderter Evolutionsmodell-Parameter vorgeschlagen, der

Wahrscheinlichkeitswert des zugehörigen Dendrogrammes ermittelt, mit demjenigen des vorhergehenden Zustands verglichen und daraufhin der Vorschlag entweder akzeptiert oder zurückgewiesen. Im Zuge des Sampling-Prozesses werden die Likelihood-Werte der gesammelten Bäume verbessert, und sie pendeln sich unter ständigem Wechsel der Evolutionsmodell-Parameter und Baumtopologien auf einem stationären Niveau ein. Bei einer genügend hohen Zahl an Generationen ist der Anteil, mit welchem ein spezifischer Baum in dem Sampling-Verfahren besucht wird, eine Näherung für seine nachträgliche Wahrscheinlichkeit, die nicht errechnet werden kann. Markov-Ketten sammeln Bäume gemäß der Häufigkeitsverteilung ihrer nachträglichen Wahrscheinlichkeiten. Um zu verhindern, daß eine einzelne Markov-Kette dabei in einem lokalen Optimum verbleibt, können mehrere Ketten miteinander verknüpft werden (Metropolis-coupled MCMC-Verfahren oder MC<sup>3</sup>), wie dies in dem Programm MrBayes implementiert ist (HUELSENBECK & RONQUIST 2001a). Die Dendrogramme mit schlechteren Likelihood-Werten aus der Anfangsphase des Sampling-Prozesses werden im Anschluß verworfen, und aus den Dendrogrammen gleich höchster Wahrscheinlichkeiten kann ein Majority-Consensus als Stammbaumrekonstruktion der Bayes'schen Analyse erstellt werden. Die Häufigkeit, mit der einzelne Gruppen dort auftreten, gibt gleichzeitig an, wie wahrscheinlich sie sind („clade credibility“). Zusätzliche statistische Verfahren zur Ermittlung solcher Unterstützungswerte können entfallen. Wird ein 50%-Majority-Consensus mit allen kompatiblen Gruppen gebildet, resultiert analog zu anderen Verfahren der Stammbaumrekonstruktion ein vollständig aufgelöstes Dendrogramm, dessen Astlängen als Durchschnitt aus den verrechneten Einzelbäumen gebildet werden.

#### **2.3.4.2 Ähnlichkeitsberechnung für die 0/1-Matrizen der RFLP-Analyse**

Ähnlichkeitsanalysen der PCR-RFLP-Muster erfolgten als Distanzanalysen mit dem Programmpaket NTSYS. In dem Programm „Similarity Measures/Qualitative“ wurden Distanzen als Ähnlichkeitswerte mit dem Coincidence-Index nach DICE (1945) berechnet, der als  $2a/(2a+b+c)$  definiert ist und der Formel von NEI & LI (1979) entspricht. Die resultierende Matrix wurde anschließend in dem Programm „SAHN Clustering“ nach dem UPGMA-Verfahren verrechnet. Um sicherzustellen, daß alle möglichen Topologien gefunden wurden, wurde nach Möglichkeit die „Find“-Option zum Verfolgen aller Clusterwege gewählt. Die graphische Wiedergabe der UPGMA-Dendrogramme erfolgte mit „Graphics/Tree Display“. In dem Programm „Cophenetic“ erstellte cophenetische Matrizen wurden in „Graphics/Matrix Comparison“ mit den ursprünglichen Distanzmatrizen verglichen.

Parsimony-Analysen der PCR-RFLP-Daten wurden mit PAUP 3.1.1 durchgeführt. Während Fitch- und Wagner-Parsimony-Verfahren den Verlust und Gewinn eines Restriktionsfragmentes gleichsetzen, wird bei „Dollo“-Parsimony, einem häufig für Restriktions-

enzymdaten gewählten Ansatz (siehe SWOFFORD & OLSEN 1990 S.459-61), ein unabhängiger Gewinn der Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym an homologen Positionen ausgeschlossen. Bei den hier verwendeten Restriktionsenzymen mit kurzen Erkennungssequenzen (siehe Tab.2.2.4.2-1) kann jedoch der parallele Gewinn von Schnittstellen ebensowenig wie der Verlust und Wiedergewinn einer spezifischen Schnittstelle ausgeschlossen werden. Die Bedeutung solcher zu Homoplasien führender Ereignisse bei der phylogenetischen Interpretation von Restriktionsenzymdaten wird bei TEMPLETON (1983) ausführlich erläutert. In dieser Arbeit wurde daher der Merkmalstyp „user-defined“ gewählt und mit einer asymmetrischen Schrittmatrix gearbeitet, die den Verlust eines Restriktionsfragmentes wahrscheinlicher macht als seinen Gewinn, diesen aber mehrfach zuläßt. Die Kosten für den Gewinn eines Fragmentes wurden aufgrund der Länge der Erkennungssequenzen auf das Vierfache der Kosten für den Verlust festgesetzt (Übergang nach 1: 4, nach 0: 1). Der benutzerdefinierte Merkmalstyp mit asymmetrischer Schrittmatrix führt immer zu gewurzelten Dendrogrammen, so daß eine Wurzelung nur über die Wahl des „Standard-Vorfahren“ möglich war, bei dem gilt: alle Merkmale als fehlende Daten („missing data“ = ?). Bei der Ermittlung des sparsamsten Baumes aus allen möglichen gewurzelten Topologien werden dabei die Merkmalszustände dieses „Standard-Vorfahren“ nach Parsimony-Grundsätzen so rekonstruiert, daß möglichst wenig Schritte nötig sind. Hierfür wurde die Funktion „ACCTRAN“ gewählt. Zum Auffinden des/der sparsamsten Bäume mit heuristischen Suchverfahren wurden folgende Einstellungen gewählt: collapse branches (of zero-length) off, starting trees by stepwise addition, addition sequence random, 100 replicates, hold 10 trees each step, swapping algorithm TBR, MulTrees on, use steepest descent on, keep, save and swap on best trees only.

Um den Einfluß der verschiedenen Enzyme zu testen, wurden gezielt die RFLP-Daten einzelner Enzyme von den Berechnungen ausgeschlossen und nur jeweils die Daten von fünf der sechs Restriktionsenzyme verrechnet. In Anlehnung an den zufälligen Ausschluß einzelner Merkmale bei Jackknifing-Verfahren erster Ordnung wird dieses Vorgehen hier als „Enzym-Jackknifing“ bezeichnet.

### 2.3.4.3 Phylogenetische Analyse von Sequenzdaten

Analysen der Sequenzdaten erfolgten mit Distanzmatrix-, Parsimony- und Likelihood-Verfahren. Distanzmatrizen wurden mit unterschiedlichen Koeffizienten errechnet, aber immer mit dem Neighbor-Joining-Algorithmus in Dendrogramme überführt. Parsimony-Analysen wurden mit dem Merkmalstyp „unordered“ durchgeführt. Als Likelihood-Verfahren wurde der Bayes'sche Ansatz verwendet. Alle so erstellten Dendrogramme sind primär ungewurzelt und wurden meist über Außengruppen-Taxa oder Midpoint Rooting nachträglich gewurzelt.

### 2.3.4.3.1 Vergleich der Domäne I der 26S rDNA innerhalb der Gattung *Exobasidium*

Für eine Ähnlichkeitsanalyse der Sequenzen der Domäne I der 26S rDNA der hier untersuchten Stämme untereinander und im Verhältnis zu *Exobasidium*-Referenzsequenzen wurde ein in MacClade erstelltes Alignment manuell optimiert. Informationen zu diesen Referenzsequenzen bzw. Stämmen (außer AJ406400) finden sich in den Arbeiten von BEGEROW *et al.* (1997, 2001, 2002a). Die folgenden in GENBANK verfügbaren *Exobasidium*-Sequenzen wurden verwendet:

<i>E. arescens</i> Nannf.	AF352057
<i>E. bisporum</i> Sawada ex Ezuka	AF487386
<i>E. gracile</i> (Shirai) Syd.	AF487387
<i>E. japonicum</i> Shirai	AF487388
<i>E. karstenii</i> Sacc. & Trotter	AF487389
<i>E. myrtilli</i> Siegm.	AF487390
<i>E. oxycocci</i> Rostr. ex Shear	AF487391
<i>E. pachysporum</i> Nannf.	AF487392
<i>E. pieridis-ovalifoliae</i> Sawada	AF487393
<i>E. reticulatum</i> Ito & Sawada	AF487394
<i>E. rhododendri</i> (Fuckel) C.E.Cramer	AF009856
<i>E. rostrupii</i> Nannf.	AF009857
<i>E. shiraianum</i> Henn.	AF487395
<i>E. sundstroemii</i> Nannf.	AF487396
<i>E. symploci-japonicae</i> Kusano & Tokubuchi	AF487397
<i>E. vaccinii</i> (Fuckel) Woronin, Stamm RB 945	AF009858
<i>E. vaccinii</i> (Fuckel) Woronin	AJ406400
<i>E. c.f. vaccinii</i> , Stamm RB 2073	AF487398
<i>E. yoshinagai</i> Henn.	AF487399

Die Analysen wurden mit PAUP\* 4.0b10 erstellt. Es wurde keine Außengruppe einbezogen. Parsimony-Analysen wurden mit heuristischen Suchverfahren durchgeführt, wobei Gaps als zusätzlicher Merkmalszustand („fünfte Base“) oder als fehlende Daten (= ?) behandelt wurden. Parsimony-Settings: collapse branches (if maximum length is zero) on, transformation = MINF. Heuristic-Settings: starting trees by stepwise addition, addition sequence random, 1.000 replicates, hold 1 tree each step, swapping algorithm TBR, MulTrees on, use steepest descent off, swap on best trees only. Im Anschluß wurden Äste mit einer maximalen Länge von 0 kollabiert, die Dendrogramme entsprechend zusammengefaßt („condense“-Funktion). Distanzanalysen mit unterschiedlichen Distanzkoeffizienten und Neighbor-Joining wurden mit den Default-Einstellungen durchgeführt, jedoch mit „break ties randomly“. Für fehlende Daten einschließlich Gaps wurde die Option „distributed proportionally to unambiguous changes“ gewählt. Bootstrap- und Jackknifing-Berechnungen wur-

den mit 1.000 Wiederholungen durchgeführt. Jackknife-Einstellungen wurden nach WEDIN *et al.* (2000) gewählt: delete 36,79%, „JAC“-Emulation. Die Berechnungen erfolgten prinzipiell mit den gleichen Einstellungen wie die eigentlichen Parsimony- bzw. Distanzanalysen. Bei Parsimony wurde auch „full heuristic search“ gewählt, jedoch wurde abweichend von oben „MulTrees“ off eingestellt, und es wurden nur 50 „random addition sequence replicates“ durchgeführt.

#### 2.3.4.3.2 Analyse der Sequenzen der Domäne I der 26S rDNA im Kontext der Ustilaginomycetes

Auch für die umfassendere phylogenetische Analyse der Domäne I wurde ein in MacClade erstelltes Alignment manuell optimiert. Als Vergleichssequenzen aus GENBANK wurden Vertreter der Exobasidiomycetidae und der Ustilaginomycetidae ausgewählt:

<i>Arcticomycetes warmingii</i> (Rostr.) Savile	AF487380
<i>Clinoconidium bullatum</i> Syd.	AF487383
<i>Conidiosporomyces ayresii</i> (Berk.) Vánky & R.Bauer	AF009848
<i>Dicellomyces scirpi</i> Raitv.	AF487385
<i>Doassansia epilobii</i> Farl.	AF007523
<i>Doassansiosis deformans</i> (Setch.) Dietel	AF009849
<i>Doassinga callitrichis</i> (Liro) Vánky, R.Bauer & Begerow	AF007525
<i>Eballistra oryzae</i> (Syd. & P.Syd.) R.Bauer, Begerow, A.Nagler & Oberw.	AF229353
<i>Entyloma calendulae</i> (Oudem.) de Bary	AJ235296
<i>Entyloma ficariae</i> A.A.Fisch. Waldh.	AJ235295
<i>Entyloma polysporum</i> (Peck) Farl.	AF007529
<i>Erratomyces patelii</i> (Pavgi & Thirum.) M.Piepenbring & R.Bauer	AF009855
<i>Georgefischeria riveae</i> Thirum. & Naras.	AF009861
<i>Graphiola cylindrica</i> Kobayasi	AF487400
<i>Graphiola phoenicis</i> (Moug.) Pat.	AF009862
<i>Ingoldiomyces hyalosporus</i> (Masse) Vánky	AF133576
<i>Jamesdicksonia ischaemiana</i> (Thirum.) R.Bauer, Begerow, A.Nagler & Oberw.	AF229355
<i>Kordyana tradescantiae</i> (Pat.) Racib.	AF487402
<i>Laurobasidium lauri</i> (Geyl.) Jülich	AF487403
<i>Malassezia furfur</i> (C.P.Robin) Baill.	AF063214
<i>Malassezia sympodialis</i> R.B.Simmons & E.Guého	AJ249953
<i>Microstroma album</i> (Desm.) Sacc.	AF352052
<i>Microstroma juglandis</i> (Berenger) Sacc.	AF009867
<i>Muribasidiospora indica</i> Kamat & Rajendren	AF352058
<i>Nannfeldtiomyces sparganii</i> (Lagerh.) Vánky	AF133578
<i>Pseudozyma antarctica</i> (Goto, Sugiy. & Iizuka) Boekhout	AJ235301

<i>Rhamphospora nymphaeae</i> D.D.Cunn.	AF007526
<i>Rhodotorula bacarum</i> (Buhagiar) Rodr.Mir. & Weijman	AF352055
<i>Sporisorium sorghi</i> Ehrenb. ex Link	AF009872
<i>Sympodiomyces paphiopedili</i> Sugiy., Tokuoka & Komag.	AF352054
<i>Tilletia caries</i> (DC.) Tul. & C.Tul.	AJ235307
<i>Tilletiaria anomala</i> Bandoni & B.N.Johri	AJ235284
<i>Tilletiopsis albescens</i> Gokhale, Stamm CBS 608.83	AJ235289
<i>Tilletiopsis flava</i> (Tubaki) Boekhout, Stamm CBS 401.84	AJ235285
<i>Tilletiopsis fulvescens</i> Gokhale, Stamm NB 244	AJ235281
<i>Tilletiopsis minor</i> Nyland, Stamm CBS 346.33	AJ235286
<i>Tilletiopsis pallescens</i> Gokhale, Stamm CBS 438.90	AJ235291
<i>Tilletiopsis washingtonensis</i> Nyland, Stamm CBS 605.83	AJ235279
<i>Ustilago maydis</i> (DC.) Corda	L20287
<i>Volvocisporium triumfeticola</i> (M.S.Patil) Begerow, R.Bauer & Oberw.	AF352053

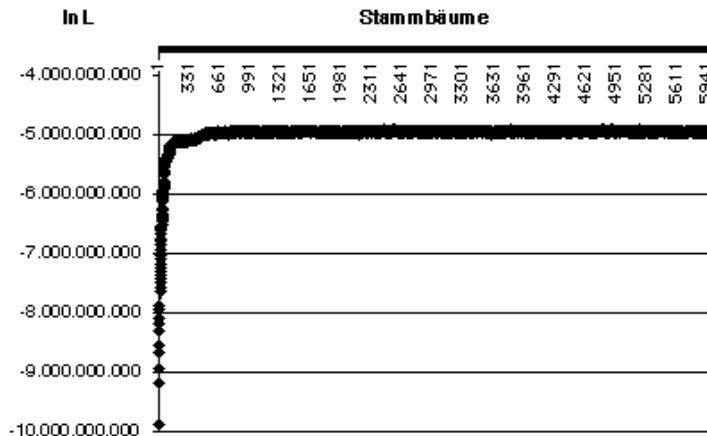
Zusätzlich wurden als Außengruppen-Taxa nach den Ergebnissen der phylogenetischen Analyse von BEGEROW *et al.* (1997) zwei Vertreter der Entorrhizomycetidae gewählt:

<i>Entorrhiza aschersoniana</i> (Magnus) De Toni	AF009851
<i>Entorrhiza casparyana</i> (Magnus) De Toni	AF009852.

Parsimony- und Distanzmatrixverfahren sowie die zugehörigen Bootstrap- und Jackknifing-Berechnungen wurden weitgehend wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben mit PAUP\* 4.0b10 durchgeführt. Da hier jedoch mit Außengruppen-Taxa gewurzelt wurde, konnte bei Parsimony-Analysen für die Merkmalsrekonstruktion „transformation = ACCTRAN“ gewählt werden, und Gaps wurden ausschließlich als fehlende Daten (= ?) kodiert. Bei Bootstrap- und Jackknifing-Berechnungen wurden bei Parsimony hier 100 „random addition sequence replicates“ eingestellt. Das Resampling für Distanzanalyse nach dem Maximum Likelihood-Modell wurde wie oben ebenfalls mit 1.000 Wiederholungen durchgeführt, bei allen anderen Koeffizienten waren es jedoch 10.000. Im Rahmen der Parsimony-Analysen wurde zusätzlich ein „Sukzessive Weighting“ eingesetzt, bei dem die individuelle Gewichtung der Einzelmerkmale nach ihren Consistency-Indizes erfolgte.

Dieser 26S rDNA-Datensatz wurde zusätzlich mit MrBayes 2.01 mit den Default-Einstellungen der „prior probabilities“ analysiert. Nachdem in einer Voranalyse die Anzahl Generationen der Markov-Ketten zum Erreichen des gleichbleibenden Niveaus an Likelihood-Werten (der sogenannte „Burnin“) auf ca. 50.000 bestimmt worden war, wurde die endgültige Analyse mit mehr als der zehnfachen Anzahl durchgeführt. Likelihood-Settings (entsprechend GTR-Modell): Substitutionstypen 6, Verteilung der Substitutionshäufigkeiten „among-site rate variation“ gamma. MCMC-Settings: Generationen 600.000, gespeichert

mit Astlängen jeder 100. Baum, Anzahl Ketten 4. Anhand der Parameter-Tabellen und durch graphischen Auftrag der Likelihood-Werte (Abb.2.3.4.3.2-1) wurde im Anschluß der endgültige Burnin bei Baum 701 festgesetzt. Damit gehen 5.300 Bäume in den Consensus ein. Nach-Analyse-Settings: Burnin 701, Consensus mit allen kompatiblen Gruppen. Der resultierende Tree-File wurde in dem Programm TreeView (PAGE 2000) graphisch aufbereitet und über die Außengruppen-Taxa gewurzelt.



**Abb.2.3.4.3.2-1 Bayes'sche Analyse: Likelihood-Werte zur Festlegung des Burnin.**

### 2.3.4.3.3 Phylogenetische Analyse der 18S rDNA-Sequenzdaten

Für die Analyse von 18S rDNA-Sequenzen wurde manuell im Olsen-Editor ein Alignment erstellt. Als Vergleichssequenzen aus GENBANK wurden Vertreter aller drei Klassen der Basidiomycota ausgewählt:

<i>Agaricus bisporus</i> (J.E.Lange) Pilát	L36658
<i>Hirneola auricula-judae</i> (L.) Berk.	L22254
<i>Boletus satanas</i> Rostk.	M94337
<i>Cronartium ribicola</i> A.Dietr.	M94338
<i>Dacrymyces stillatus</i> Nees	L22258
<i>Erythrobasidium hasegawianum</i> Hamam., Sugiy. & Komag.	D12803
<i>Graphiola cylindrica</i> Kobayasi	D63929
<i>Graphiola phoenicis</i> (Moug.) Pat.	D63928
<i>Microbotryum violaceum</i> (Pers.) G.Deml & Oberw.	U77062
<i>Rhodosporeidium toruloides</i> Banno	D12806
<i>Russula compacta</i> Frost	U59093
<i>Schizophyllum commune</i> (L.) Fr.	X54865

<i>Tilletia caries</i> (DC.) Tul. & C.Tul.	U00972
<i>Tilletiaria anomala</i> Bandoni & B.N.Johri	D83193
<i>Tilletiopsis albescens</i> Gokhale, Stamm JCM 5182 = CBS 608.83	D83188
<i>Tilletiopsis flava</i> (Tubaki) Boekhout, Stamm JCM 5186 = CBS 401.84	D82819
<i>Tilletiopsis minor</i> Nyland, Stamm JCM 8361 = CBS 543.50	D83190
<i>Tilletiopsis pallescens</i> Gokhale, Stamm JCM 5230 = CBS 606.83	D83191
<i>Tremella foliacea</i> Pers.	L22262
<i>Ustilago hordei</i> Bref.	U00973
<i>Ustilago maydis</i> (DC.) Corda	X62396

Auf die Einbeziehung einer zusätzlichen Außengruppe wurde verzichtet, da die Vertreter der Hymeno- und Urediniomycetes als ausreichend erachtet werden, um die Stellung der hier analysierten *Exobasidium*-Stämme innerhalb der Exobasidiomycetidae zu ermitteln.

Parsimony- und Distanzmatrixanalysen sowie die zugehörigen Bootstrap- und Jackknifing-Berechnungen wurde mit PAUP\* 4.0b2 ähnlich wie in Kapitel 2.3.4.3.1 beschrieben durchgeführt. Bei Parsimony wurde jedoch „collapse zero branches“ off sowie „steepest descent“ on gewählt, aber dafür nur 500 „random addition sequence replicates“ durchlaufen. Gaps wurden ausschließlich als fehlende Daten (= ?) kodiert. Resampling-Verfahren wurden immer mit 10.000 Wiederholungen durchgeführt, bei Parsimony jedoch nur 10 „random addition sequence replicates“ und als „swapping algorithm“ SPR eingestellt.



## 3 Ergebnisse

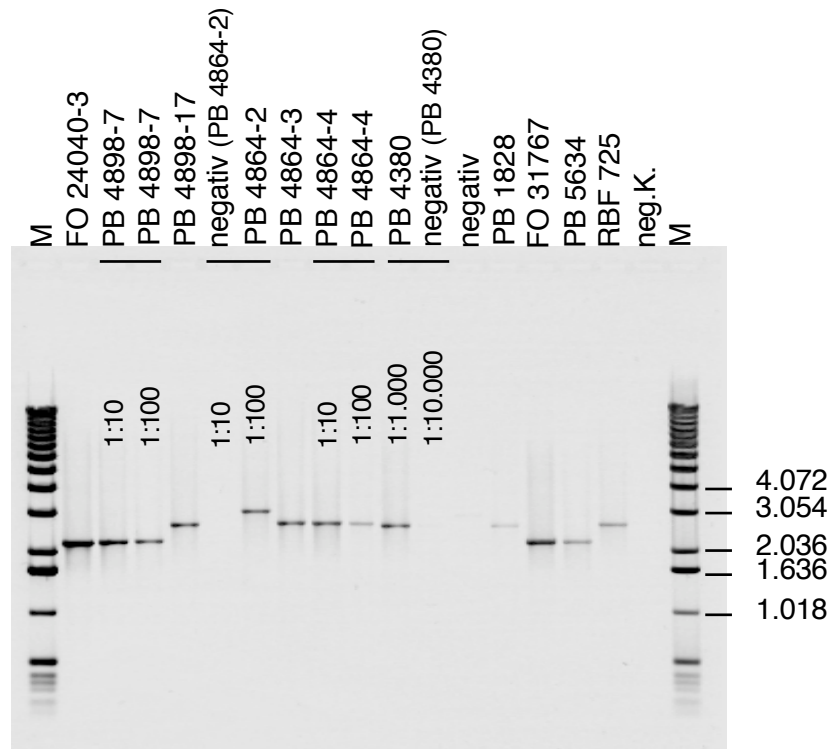
### 3.1 Gruppierung der Stämme nach PCR-RFLP-Daten des 5'-Bereichs der 26S rDNA

#### 3.1.1 DNA-Isolierung und PCR-Erfolg

Die quantitative und qualitative DNA-Ausbeute von DNA-Isolierungen wurde über Agarosegelelektrophoresen abgeschätzt. Danach erbrachten gut 50% aller durchgeführten DNA-Isolierungen qualitativ hochwertige DNA mit Fragmentgrößen über 10 kb, von denen einige (1/7) allerdings zusätzlich auch schon stärker gescherter DNA aufwiesen. Etwa 15% der DNA-Isolierungen resultierten ausschließlich in stärker gescherter DNA und rund 35% blieben ganz ohne im Gel sichtbare DNA. Es war kein Unterschied zwischen den beiden verwendeten Zellaufschlußmethoden auffallend. Auch konnte keine eindeutige Korrelation zwischen späterem PCR-Erfolg und der nach den Gelbildern beurteilten DNA-Quantität und -Qualität festgestellt werden. Qualitativ hochwertige DNAs ergaben zu 93% PCR-Produkte. Aber selbst aus Proben, die keine im Gel sichtbare DNA enthielten, ließ sich in etwas mehr als der Hälfte der Fälle der gewünschte rDNA-Abschnitt amplifizieren. Bei einem konstanten Volumen von DNA-Lösung (10  $\mu$ l) in den 25  $\mu$ l-PCR-Ansätzen ergaben DNA-Verdünnungen von 1:100 oder 1:1.000 unabhängig von der Ausgangsqualität meist die besten Ergebnisse. Verdünnungen von 1:10 oder 1:10.000 brachten vereinzelt PCR-Erfolge. Häufig resultierte nur aus einer einzigen DNA-Verdünnung eine gute Amplifikation. Beispielhaft zeigt dies Abb.3.1.1-1 an vier DNAs, von denen parallel zwei unterschiedliche Verdünnungen getestet wurden.

Frisch isolierte DNAs ließen sich am besten amplifizieren. Die Wiederholung einer PCR-Reaktion in kurzem zeitlichen Abstand ergab meistens ein ähnliches Ergebnis, allerdings teilweise mit unterschiedlicher Intensität. Bei den durchgeführten DNA-Minipräparationen handelt es sich um Gesamtnukleinsäure-Isolierungen. Dementsprechend waren auf den DNA-Kontrollgelen häufig niedermolekulare RNA-Fractionen (mRNAs, tRNAs) und/oder rRNA-Banden zu erkennen, und bei einigen Proben, die in den PCR-Ansätzen Schwierigkeiten bereiteten, wurde nachträglich eine RNase-Behandlung durchgeführt. Aber auch dieser zusätzliche Schritt brachte keine Verbesserung der PCR-Ergebnisse. Bei allen PCR-Ansätzen wurde als Letztes eine Negativkontrolle pipettiert. Da nie PCR-Produkte in diesen Negativkontrollen auftraten, können Kontaminationen der PCR-Ansätze beim Pipettieren oder durch die verwendeten Lösungen ausgeschlossen werden. Als Kontrolle wurde bei einer

DNA-Isolierung eine Agarprobe „mitbehandelt“, da die DNA-Präparationen aus Kulturen direkt von Agarplatten erfolgten. Anschließende PCRs waren negativ und bestätigten, daß der Agar keine amplifizierungsfähige DNA beinhaltet.

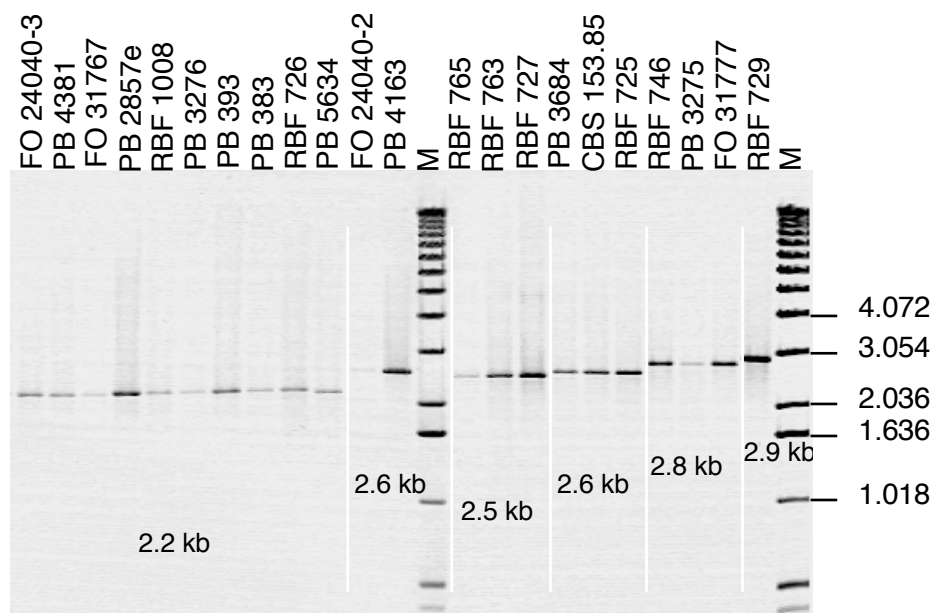


**Abb.3.1.1-1: Kontrollgel eines PCR-Ansatzes mit Primerpaar LR0R/LR9: Beispiele für den Einfluß verschiedener DNA-Verdünnungen auf den PCR-Erfolg.** 0,7%-iges Agarosegel in 1x TAE. In CAM geometrisch korrigiert, mit Image Filtern behandelt, Kontrast verstärkt, gespeicherter tif-File. Bildausschnitt, inverse Darstellung. DNA-Größenstandard (M) = 1kb DNA-Leiter, Stammnummern angegeben, negativ = Spuren ohne erfolgreiche Amplifikation, neg.K. = Negativkontrolle. Bei den vier Parallelansätzen sind die Verdünnungsstufen angegeben.

### 3.1.2 PCR-Produktgrößen des 5'-Bereichs der 26S rDNA

Mit dem Primerpaar LR0R/LR9 wurde für spätere RFLP-Analysen der 5'-Bereich der 26S rDNA (siehe Tab.2.2.3.1-1 und Anhang II) bei verschiedenen Stämmen der Gattung *Exobasidium* amplifiziert. Die PCR-Produkte der *Exobasidium*-Stämme wiesen unterschiedliche Größen auf, die alle zwischen der 2.036 und der 3.054 bp großen Bande der 1kb DNA-Leiter lagen. Nur über große Gele mit längerer Trennstrecke ließen sich die PCR-Produkte in fünf Größenklassen mit ungleichmäßigen Abständen einteilen. Diesen PCR-Produktgrößen-

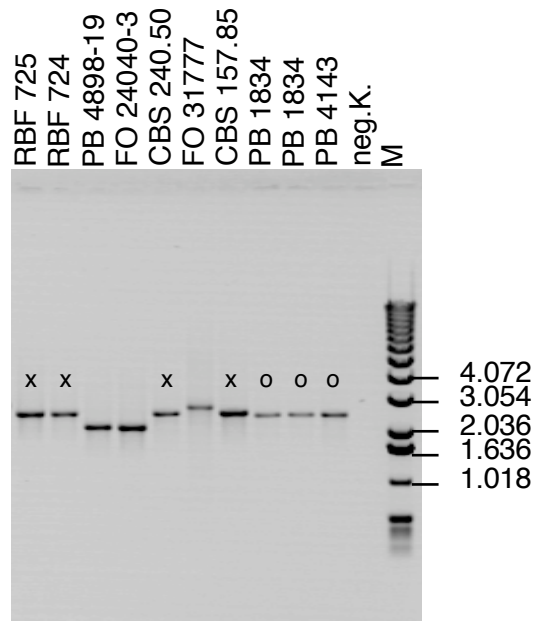
klassen werden folgende Größen zugeordnet: 2.2, 2.5, 2.6, 2.8 und 2.9 kb (Abb.3.1.2-1). Zur Zuordnung einzelner PCR-Produkte zu einer Größenklasse war neben dem Vergleich mit den DNA-Größenstandards vor allem auch der interne Vergleich der PCR-Produkte untereinander wichtig. Die auf rund 100 bp geschätzten Abstände zwischen den 2.5 und 2.6 bzw. den 2.8 und 2.9 kb großen PCR-Produkten wurden in routinemäßig durchgeführten, kleinen Kontrollgelen (Abb.3.1.2-2) nicht aufgetrennt, wodurch dort der Eindruck von nur drei PCR-Produktgrößen erweckt wird.



**Abb.3.1.2-1:** 26S rDNA PCR-Produkte mit dem Primerpaar LR0R/LR9 in einem gut auftrennenden Gel mit langer Trennstrecke. 0,8%-iges Agarosegel in 1x TAE. In CAM geometrisch korrigiert, mit Image Filtern kontrastiert, gespeicherter tif-File. Bildausschnitt, inverse Darstellung. DNA-Größenstandard (M) = 1kb DNA-Leiter, Stammnummern angegeben. In dem speziell zur Größenbestimmung der PCR-Produkte angefertigten Vergleichsgel werden alle fünf PCR-Produktgrößen aufgetrennt.

Insgesamt konnte der 5'-Bereich der 26S rDNA von 51 *Exobasidium*-Stämmen erfolgreich amplifiziert werden (Tab.3.1.2-1). Darunter waren von zwei Pilz-Isolaten auch je zwei parallel in verschiedenen Stammsammlungen gehaltene Kulturen (PB 393 = RBF 1008 und CBS 153.85 = RBF 725). Die zusammengehörigen Kulturen hatten jeweils identische PCR-Produktgrößen. Ein homologes PCR-Produkt von *Saccharomyces cerevisiae* mit dem Primerpaar LR0R/LR9 - berechnet nach dem GENBANK-Eintrag J01355 (siehe Anhang I) - hat eine Größe von 2.179 bp. Die kleinsten bei den *Exobasidium*-Stämmen auftretenden Amplifikate in der 2.2 kb-Größenklasse stimmen also mit der im Vergleich zu *Saccharo-*

*myces cerevisiae* zu erwartenden PCR-Produktgröße überein. Dies trifft für 15 *Exobasidium*-Stämme zu, während 36 Stämme größere PCR-Amplifikate ergaben.



**Abb.3.1.2-2:** 26S rDNA PCR-Produkte mit dem Primerpaar LR0R/LR9 in dem Kontrollgel eines PCR-Ansatzes mit kurzer Trennstrecke. 1,5%-iges Agarosegel in 1x TAE. In CAM geometrisch korrigiert, gespeicherter tif-File. Bildausschnitt, inverse Darstellung. DNA-Größenstandard (M) = 1kb DNA-Leiter, Stammnummern angegeben, neg.K. = Negativkontrolle. PCR-Produkte mit geringeren Größenunterschieden werden in solchen Gelen nur unvollständig aufgetrennt. Die Banden mit 2.5 kb (o) und 2.6 kb (x) sind nicht unterscheidbar, die übrigen PCR-Produkte auf diesem Bild sind 2.2 bzw. 2.8 kb groß.

Die meisten Wirtsgattungen und selbst Wirtsarten der untersuchten *Exobasidien* finden sich in mehreren PCR-Produktgrößenklassen. Bei den Stämmen der 2.2 kb-Größenklasse treten als Wirte verschiedene *Vaccinium*- und *Rhododendron*-Arten auf, wie in der 2.6 kb-Größenklasse, wo zusätzlich *Menziesia ferruginea* vertreten ist. *Menz. ferruginea* ist auch Wirt bei Stämmen der 2.9 kb-Größenklasse, wie auch *Andromeda polifolia* und *Thea sinensis*. Die 2.5 kb- und die 2.8 kb-Größenklassen werden ausschließlich von Stämmen mit Wirten aus der Gattung *Vaccinium* gebildet.

**Tab.3.1.2-1:** Die fünf Größenklassen der 26S rDNA PCR-Produkte mit dem Primerpaar LR0R/LR9 bei *Exobasidium*-Stämmen. Sortiert nach PCR-Produktgröße, Wirtspflanze und Stammnummer. Entsprechende PCR-Produkte sind in Abb.2.3.1.2-1, Abb.3.1.1-1, Abb.3.1.2-1 und -2 zu sehen.

Stamm		Wirt	2.2kb	2.5kb	2.6kb	2.8kb	2.9kb
FO 24040-3	<i>E. rhododendri</i>	<i>Rh. ferrugineum</i>	+				
FO 31767	<i>E. rhododendri</i>	<i>Rh. ferrugineum</i>	+				
PB 4381	<i>E. rhododendri</i>	<i>Rh. hirsutum</i>	+				
PB 2857e	<i>E. rhododendri</i>	<i>Rh. x intermedium</i>	+				
PB 5634	<i>E. rhododendri</i>	<i>Rh. x intermedium</i>	+				
PB 4898-3	<i>E. rhododendri</i>	<i>Rh. spec.</i>	+				
PB 4898-7	<i>E. rhododendri</i>	<i>Rh. spec.</i>	+				
PB 4898-9	<i>E. rhododendri</i>	<i>Rh. spec.</i>	+				
PB 4898-16	<i>E. rhododendri</i>	<i>Rh. spec.</i>	+				
PB 4898-19	<i>E. rhododendri</i>	<i>Rh. spec.</i>	+				
PB 3276	<i>E. oxycocci</i>	<i>V. oxycoccos</i>	+				
PB 383	<i>E. vaccinii</i>	<i>V. uliginosum</i>	+				
PB 393 = RBF 1008	<i>E. vaccinii</i>	<i>V. vitis-idaea</i>	+				
RBF 1008 = PB 393	<i>E. vaccinii</i>	<i>V. vitis-idaea</i>	+				
RBF 726	<i>E. julianum</i>	<i>V. vitis-idaea</i>	+				
CBS 183.56	<i>E. vaccinii</i>	<i>V. vitis-idaea</i>		+			
FO 31761	<i>E. myrtilli</i>	<i>V. vitis-idaea</i>		+			
PB 394	<i>E. myrtilli</i>	<i>V. vitis-idaea</i>		+			
PB 1834	<i>E. myrtilli</i>	<i>V. vitis-idaea</i>		+			
PB 3385	<i>E. myrtilli</i>	<i>V. vitis-idaea</i>		+			
PB 4143	<i>E. myrtilli</i>	<i>V. vitis-idaea</i>		+			
RBF 727	<i>E. julianum</i>	<i>V. vitis-idaea</i>		+			
RBF 763	<i>E. vaccinii</i>	<i>V. vitis-idaea</i>		+			
RBF 765	<i>E. vaccinii</i>	<i>V. vitis-idaea</i>		+			
CBS 153.85 = RBF 725	<i>E. japonicum</i>	<i>Rh. indicum</i>			+		
RBF 725 = CBS 153.85	<i>E. japonicum</i>	<i>Rh. indicum</i>			+		
PB 3684	<i>E. japonicum</i>	<i>Rh. indicum</i> cult.			+		
RBF 724	<i>E. japonicum</i>	<i>Rh. indicum</i>			+		
PB 4864-3	<i>E. rhododendri</i>	<i>Menz. ferruginea</i>			+		
PB 4864-4	<i>E. rhododendri</i>	<i>Menz. ferruginea</i>			+		
CBS 157.85	<i>E. shiraianum</i>	<i>Rh. degrobianum</i>			+		
FO 24040-2	<i>E. rhododendri</i>	<i>Rh. ferrugineum</i>			+		
PB 4163	<i>E. rhododendri</i>	<i>Rh. ferrugineum</i>			+		
PB 4380	<i>E. rhododendri</i>	<i>Rh. ferrugineum</i>			+		
CBS 240.50	<i>E. rhododendri</i>	<i>Rh. hirsutum</i>			+		
PB 4898-17	<i>E. rhododendri</i>	<i>Rh. spec.</i>			+		
PB 4898-18	<i>E. rhododendri</i>	<i>Rh. spec.</i>			+		
PB 1828	<i>E. vaccinii</i>	<i>V. myrtillos</i>			+		
FO 31778	<i>E. vaccinii</i>	<i>V. uliginosum</i>			+		
PB 4153	<i>E. vaccinii</i>	<i>V. uliginosum</i>			+		
RBF 737	<i>E. pachysporum</i>	<i>V. uliginosum</i>			+		
PB 3277	<i>E. vaccinii</i>	<i>V. macrocarpum</i>				+	
FO 31777	<i>E. vaccinii</i>	<i>V. oxycoccos</i>				+	
PB 3275	<i>E. vaccinii</i>	<i>V. oxycoccos</i>				+	
RBF 746	<i>E. rostrupii</i>	<i>V. oxycoccos</i>				+	
PB 5635	<i>E. karstenii</i>	<i>And. polifolia</i>					+
RBF 729	<i>E. karstenii</i>	<i>And. polifolia</i>					+
RBF 732	<i>E. karstenii</i>	<i>And. polifolia</i>					+
RBF 733	<i>E. karstenii</i>	<i>And. polifolia</i>					+
PB 4864-2	<i>E. rhododendri</i>	<i>Menz. ferruginea</i>					+
CBS 156.85	<i>E. reticulatum</i>	<i>Thea sinensis</i>					+

### **kb-Bestimmung der 26S rDNA PCR-Produkte mit CAM**

Zusätzlich zu der manuellen Auswertung wurde eine kb-Bestimmung mit dem Programm CAM durchgeführt, da für die Berechnung der Summen der Restriktionsfragmentlängen bei den PCR-RFLP-Auswertungen (siehe Kapitel 3.1.3.1.3) möglichst genaue Referenzwerte zum Vergleich von PCR-Produktgröße und Summe der Fragmentlängen benötigt wurden. Die Größe der 26S rDNA PCR-Produkte der untersuchten *Exobasidium*-Stämme wurde in 13 repräsentativen Gelbildern mit CAM bestimmt (Anhang V). Dabei stellten sich z.T. deutliche Abweichungen bei den bestimmten bp-Werten verschiedener PCR-Produkte eines Stammes heraus. Der maximal festgestellte, prozentuale Unterschied (= die Differenz zwischen maximalem und minimalem Wert eines Stammes bezogen auf dessen Minimalwert) in einem Gel beträgt fast 4% (Anhang V, Gel 11: PB 2857e oder auch RBF 746). Der maximal festgestellte, prozentuale Unterschied zwischen verschiedenen Gelen hingegen beträgt um 11% (Anhang V: letzte Spalte). Um diese Abweichungen besser beurteilen zu können, wurden die bp-Werte für DNA-Fragmente definierter Größe bestimmt - nämlich für die Banden der in den Gelen zur geometrischen Korrektur mitlaufenden zusätzlichen Spuren der DNA-Größenstandards (repräsentative Beispiele in Anhang VI). Im relevanten Größenbereich von 1-4 kb treten hier Abweichungen bis zu  $\pm 5\%$  zwischen den mit CAM ermittelten Größen und den tatsächlichen Fragmentgrößen der Marker auf. In PCR-Produktgelen mit der 1kb DNA-Leiter als DNA-Größenstandard wurde die 3.054 bp-Bande mit Abweichungen von +5,08% bis -2,69% und die 2.036 bp-Bande mit Abweichungen von +3,05% bis -2,06% bestimmt. In Gelen mit längeren Trennstrecken sind geringere Abweichungen festzustellen als in solchen mit kurzer Auftrennung. Von einem 3.000 bp großen PCR-Produkt könnten bei  $\pm 5\%$  Differenz damit Werte von rund 2.850 bp bis zu etwa 3.150 bp ermittelt werden. Die so abgeschätzte Ungenauigkeit der kb-Bestimmung mit CAM in einfachen Agarosegelen erklärt auch die gefundenen Abweichungen bei den Bestimmungen der PCR-Produktgrößen eines Stammes und unterstreicht die Bedeutung der schon bei der manuellen Auswertung erwähnten direkten Vergleichsmöglichkeiten, die nur durch interne Standards zwischen verschiedenen Gelen gegeben sind. Auf wenige Basenpaare genaue Größen lassen sich auch mit Hilfe dieses Programmes nicht sicher bestimmen. Die kb-Bestimmungen mit CAM widersprechen den Zuordnungen der PCR-Produkte zu den fünf Größenklassen nicht. Vor allem bei den größeren Gelen mit längerer Auftrennung bestätigen die CAM-Werte die manuell abgeschätzten Größen (Anhang V, Gele 1 bis 3).

### 3.1.3 PCR-RFLP-Analysen des 5'-Bereichs der 26S rDNA

Der mit dem Primerpaar LR0R/LR9 amplifizierte 5'-Bereich der 26S rDNA wurde in sechs parallelen Ansätzen mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen hydrolysiert (Beispiele in Abb.3.1.3-1). Für eine systematisch-phylogenetische Analyse der bei der elektrophoretischen Auftrennung der Fragmente entstehenden Muster ist eine exakte Auswertung der Gelbilder Voraussetzung, um Aussagen über identische RFLP-Muster bei verschiedenen Stämmen zu treffen und um Ähnlichkeitsberechnungen zwischen unterschiedlichen RFLP-Mustern durchzuführen. Daher werden im folgenden vor der Auswertung der PCR-RFLP-Muster die CAM-Bearbeitungen (kb-Bestimmung, 1D-Analyse) zur genauen Charakterisierung der einzelnen Restriktionsfragmente, sowie die zur Kontrolle wichtigen Berechnungen der Summen der Fragmentlängen, dargestellt.

#### 3.1.3.1 Charakterisierung der Restriktionsfragmente und -muster

##### 3.1.3.1.1 Zur Genauigkeit der Fragmentgrößenbestimmung in der VisiGel-Matrix

Bei der Größenbestimmung der PCR-Produkte im vorhergehenden Kapitel wurde die Ungenauigkeit der kb-Bestimmung in normalen Agarosegelen angesprochen. Zur Minimierung der Ungenauigkeiten wurden die PCR-RFLP-Gele mit der VisiGel-Matrix durchgeführt, die ein besseres Auftrennungsverhalten bei Größen bis etwa 1 kb besitzt. Abschätzungen der Abweichungen der kb-Bestimmung in CAM wurden auch hier anhand der Fragmente der 1kb DNA-Leiter vorgenommen sowie durch Vergleiche der Fragmente der internen Standards. Als drittes wurde noch der Einfluß der Bandenmarkierungen in der Markerspür bei der Erstellung der Eichkurve geprüft.

##### 1) Nachbestimmung der Fragmente des DNA-Größenstandards

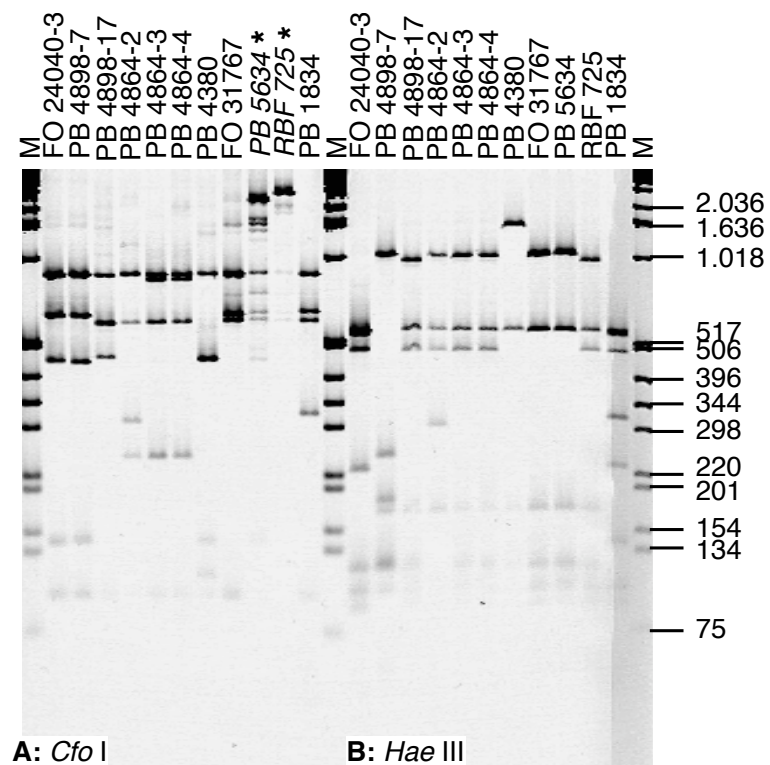
Die nachbestimmten Größen der Fragmente der 1kb DNA-Leiter eines ausgewählten Gelaufes ohne größere „Smiling“-Effekte, der über fünf Markerspuren auch gut geometrisch korrigiert werden konnte, sind in Anhang VII aufgelistet. Im Bereich unter 500 bp Größe ist die kb-Bestimmung in der VisiGel-Matrix mit Abweichungen bis zu  $\pm 1,5\%$  relativ genau möglich. Die 75 bp-Bande war hierbei die einzige Ausnahme, wenn sie nicht so scharf fokussiert war wie die Banden größerer Fragmente ( $\pm 2,7\%$ ). Die Fragmente von 506 und 517 bp Größe wurden im allgemeinen schlechter bestimmt. Diese dicht beieinander liegenden Banden beeinflussen sich gegenseitig in ihrem Laufverhalten, so daß Abweichungen von  $-5,7\%$

bis +2,5% zu beobachten waren. Größere Abweichungen finden sich erwartungsgemäß bei dem 1.018 bp großen Fragment (bis zu  $\pm 8\%$ ).

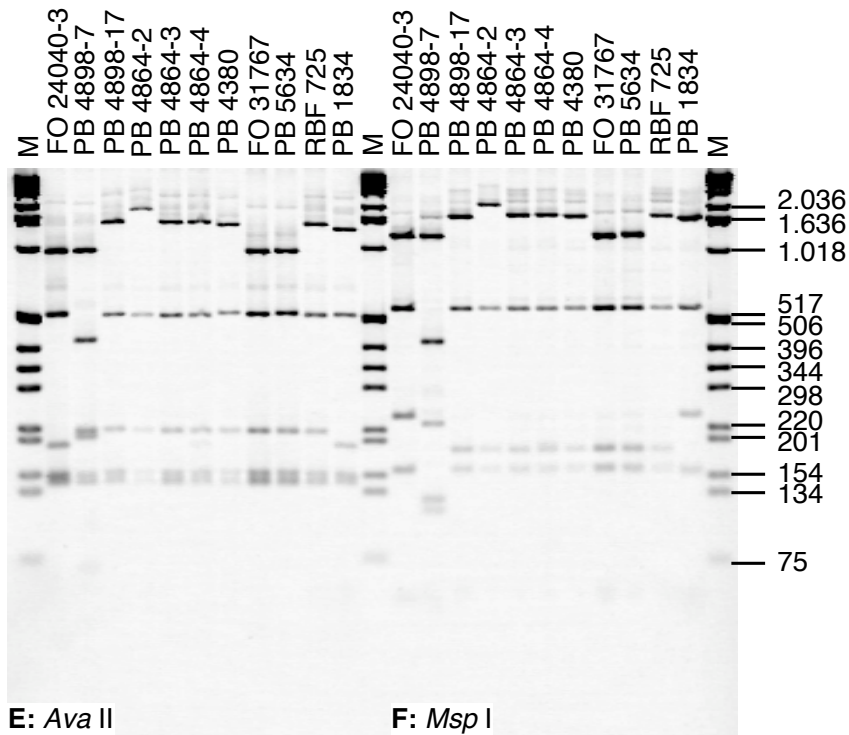
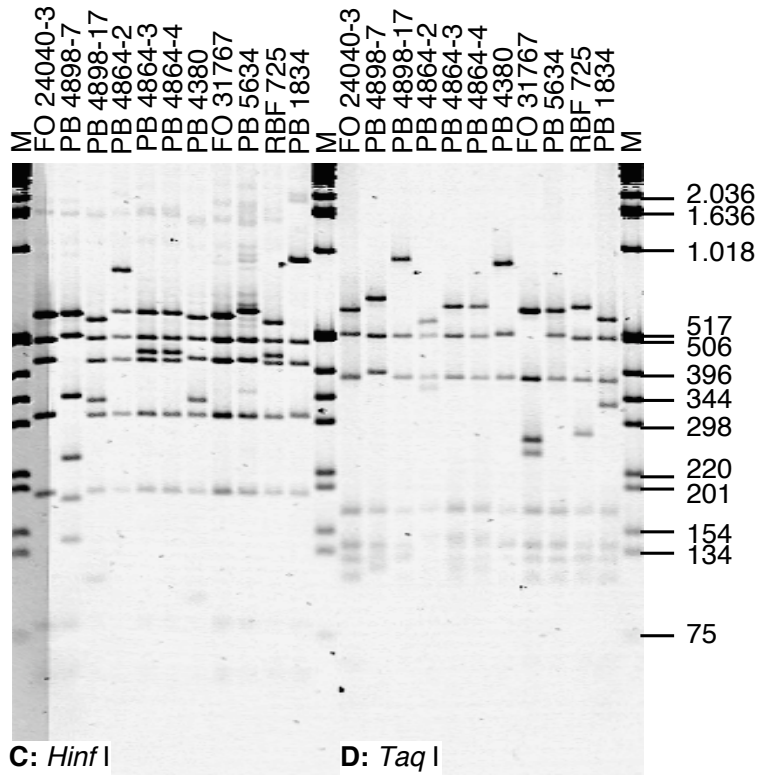
## **2) Vergleich der Fragmentgrößen interner Standards**

In den PCR-RFLP-Gelen waren Parallelansätze derselben Proben auf mehreren Gelen als interne Standards aufgetragen worden. Bei zwei getrennten Gelläufen wurde der prozentuale Unterschied bei der Größenbestimmung dieser Fragmente ermittelt (= die Differenz bezogen auf den Minimalwert, Anhang VIII). Die Unterschiede lagen meist unter 3%, wie dies nach den festgestellten Abweichungen bei den Markerbanden zu erwarten war. Auch die maximalen Unterschiede (8-9%) liegen innerhalb der oben ermittelten Abweichungen.

**Abb.3.1.3-1: PCR-RFLP-Muster von *Exobasidium*-Stämmen.** Mit drei Gelbildern (VisiGel-Matrix) werden bei 11 Stämmen die sechs parallelen RFLP-Analysen der PCR-Produkte des Primerpaares LR0R/LR9 gezeigt. DNA-Größenstandard (M) = 1kb DNA-Leiter, Stammnummern angegeben, \* = nicht vollständig hydrolysierte PCR-Produkte (nicht auswertbar - die Hydrolysen wurden wiederholt). Die Gelbilder sind geometrisch korrigiert, invertiert und Kontrast verstärkt. Durch nicht speicherbare Bildschirmstellungen sind die Banden unter ca. 150 bp Größe bei den CAM-Analysen deutlicher erkennbar.







### **3) Abhängigkeit der Fragmentgrößenbestimmung von der Eichkurve**

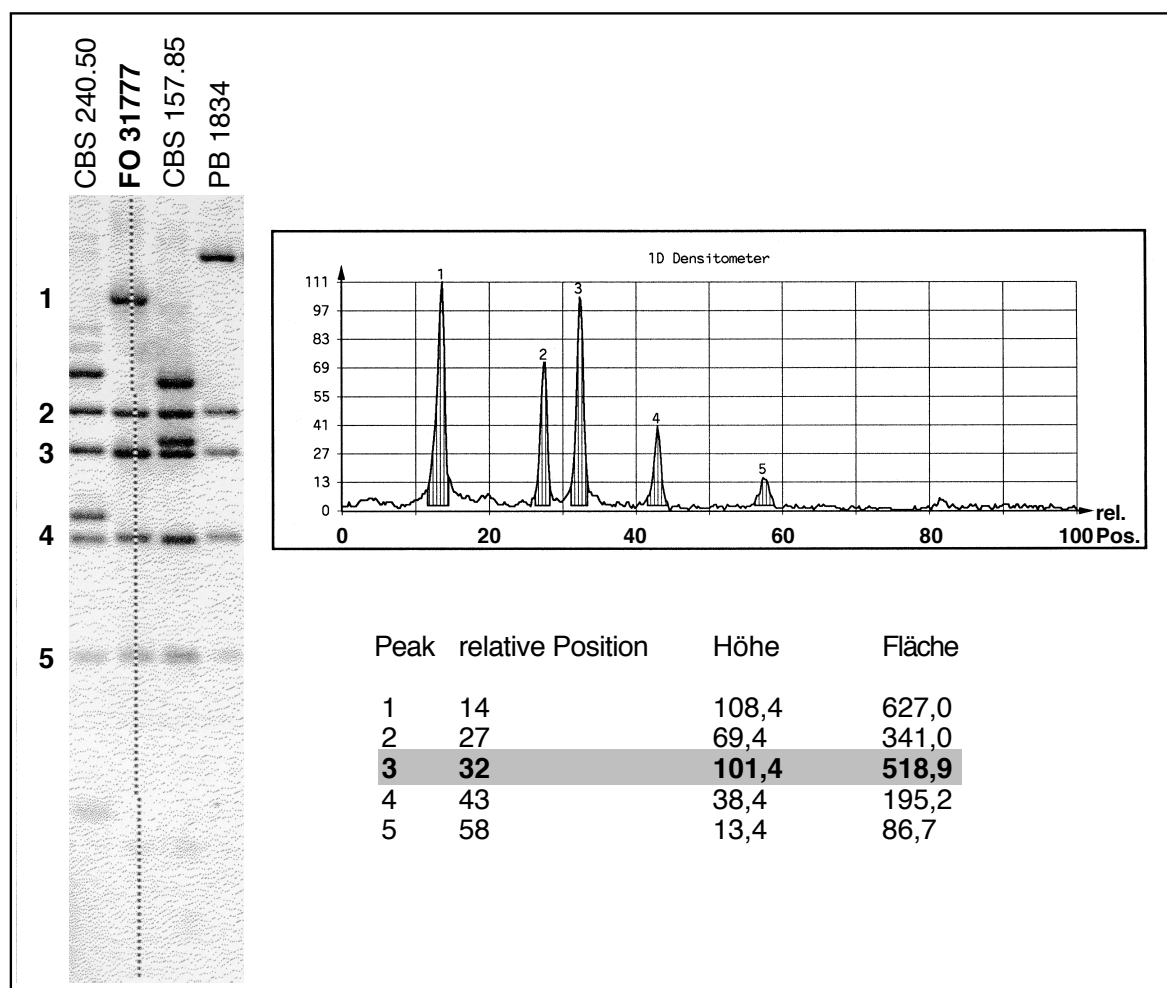
Die Festlegung der Banden innerhalb der Markerspür, die als „Standard“ bei der CAM-Auswertung definiert wird, muß Einfluß auf die Bestimmung der Fragmentgrößen haben, da aus diesen markierten Banden die Eichkurve für die kb-Bestimmung errechnet wird (siehe dazu Kapitel 2.3.1.4). Anhand eines PCR-RFLP-Gelbildes wurde dieser Effekt überprüft, indem drei unterschiedliche Eichkurven definiert und jeweils die Fragmentgrößen von 15 ausgewählten Banden bestimmt wurden, welche das Größenspektrum der in den PCR-RFLP-Analysen auftretenden Fragmente abdecken (Anhang IX). Im Größenbereich von etwa 100 bis 1.000 bp zeigen sich nur geringste Unterschiede bei den bestimmten Fragmentgrößen (unter 1%). Betrachtet man jedoch sehr kleine oder auch größere Fragmente im Randbereich der Eichkurven, wo die Größen z.T. über eine Extrapolation bestimmt werden, so nehmen die Unterschiede deutlich zu (bis 13%). Die Definition der Eichkurven ist damit neben den Auftrennungseigenschaften der Gele ein zweiter Faktor, der sich auf die kb-Bestimmung in CAM auswirkt. Es wurden daher bei den Gelauswertungen zur Berechnung der jeweiligen Eichkurve alle irgend markierbaren Markerbanden herangezogen, um den jeweiligen Auftrennungsverhältnissen entsprechende Eichkurven zu erhalten.

Die bp-Bestimmung mit CAM in den PCR-RFLP-Gelen der VisiGel-Matrix ist wesentlich genauer als bei den PCR-Gelen mit normalen Agarosen. Unter Zuhilfenahme der verschiedenen Methoden zur Abschätzung der Ungenauigkeit konnten in den PCR-RFLP-Gelen die Fragmentgrößen relativ genau bestimmt und zugeordnet werden. Bei der Charakterisierung der Fragmente aller Restriktionsmuster in der 0/1-Matrix wurden die bp-Werte der einzelnen Fragmente auf Abstände von fünf Basenpaaren genau angegeben (siehe Tab. 3.1.3.3-1). Die Zuordnung von fast gleich großen Restriktionsfragmenten in verschiedenen Gelen ausschließlich aufgrund ihrer in CAM bestimmten Größe ist aber auch mit der VisiGel-Matrix nicht immer eindeutig, weshalb der Einsatz interner Standards für die Auswertung der RFLP-Muster und das Homologisieren von Banden zwischen verschiedenen Gelen essentiell war. Jedoch war die schnelle Bestimmung von bp-Werten mit CAM neben der Gewinnung eines raschen Überblicks und einer ersten Charakterisierung der Fragmente jedes Geles sehr hilfreich für die Ermittlung der Summen der Fragmentlängen der Restriktionsprodukte, welche als Kontrollwert mit der Größe der zugrunde liegenden PCR-Produkte verglichen wurde (siehe Kapitel 3.1.3.1.3).

#### **3.1.3.1.2 Nachweis von Mehrfachbanden über 1D-Analyse**

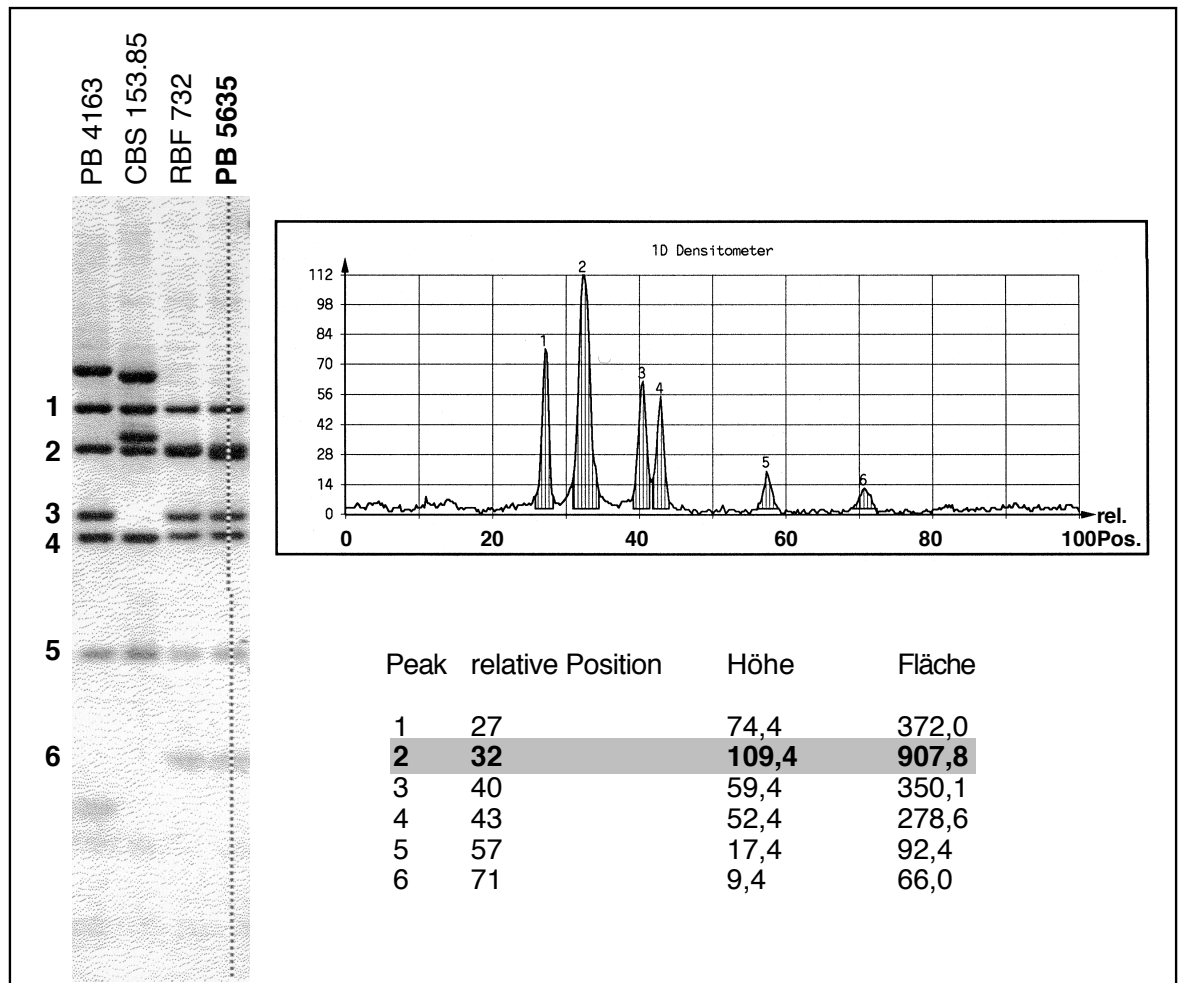
Restriktionsfragmente einer Hydrolyse mit identischer oder annähernd gleicher Größe er-

scheinen im Gelbild als eine einzige Bande (hier als „Mehrfachbande“ bezeichnet), die sich durch eine verstärkte Fluoreszenz auszeichnet. Zum Nachweis solcher Mehrfachbanden und zur Bestimmung der Anzahl der Fragmente in diesen Banden diente die densitometrische Analyse in CAM. Ein Beispiel für die Charakterisierung einer Doppelbande im densitometrischen Profil ist in Abb.3.1.3.1.2-1 gezeigt. Die Bande 3 des Stammes FO 31777 enthält zwei Restriktionsfragmente. Die Peakfläche von Bande 3 sollte im Vergleich zu allen anderen Peaks etwa zwischen 250 und 300 liegen, sie beträgt aber 518,9. Auch die Peakhöhe von 101,4 ist etwa zweimal größer als von einem einzelnen Fragment zu erwarten wäre.



**Abb.3.1.3.1.2-1: Nachweis von zwei nicht aufgetrennten Fragmenten in einer Doppelbande mit der 1D-Analyse.** Restriktionsansatz mit *Hinf*I, densitometrische Analyse von FO 31777. Bildausschnitt eines eingescannten Originalausdruckes mit „Densitometerlinie“ und zugehörigem Profil. Für die in CAM automatisch erkannten Banden 1-5 wurde eine Basislinie zur Bestimmung der Peakflächen festgelegt. Die resultierenden Werte sind in der Tabelle wiedergegeben, die Doppelbande (3) ist hervorgehoben.

Zum Vergleich ist in Abb.3.1.3.1.2-2 das Profil einer Dreifachbande bei Stamm PB 5635 gezeigt. Die Peakfläche von Bande 2 zeigt hier mit 907,8 fast das Dreifache der Fläche, die von einem einzelnen Fragment im Vergleich zu allen anderen Peaks zu erwarten wäre. Die hohen DNA-Mengen in solchen Banden führten bei den Peakhöhen jedoch zu einer nicht mehr proportionalen Zunahme der Werte. Hier ist sie mit 109,4 nur etwa zweifach erhöht. Aus diesem Grund wurden Mehrfachbanden in der 1D-Analyse mit Hilfe der Peakflächen bestimmt.



**Abb.3.1.3.1.2-2: Nachweis von drei nicht aufgetrennten Fragmenten in einer Dreifachbande mit der 1D-Analyse.** Restriktionsansatz mit *Hinf*I, densitometrische Analyse von PB 5635. Bildausschnitt eines eingescannten Originalausdruckes mit „Densitometerlinie“ und zugehörigem Profil. Für die in CAM automatisch erkannten Banden 1-6 wurde eine Basislinie zur Bestimmung der Peakflächen festgelegt. Die resultierenden Werte sind in der Tabelle wiedergegeben, die Dreifachbande (2) ist hervorgehoben.

Das Auftreten von mehr als drei Restriktionsfragmenten in einer einzigen Bande

konnte bei keinem der hydrolysierten PCR-Produkte festgestellt werden. Die gemeinsam laufenden Restriktionsfragmente von Mehrfachbanden, die in den RFLP-Mustern über die 1D-Analyse nachgewiesen wurden, sind in der 0/1-Matrix der Fragmente aller Restriktionsmuster gekennzeichnet (graue Schattierung in Tab.3.1.3.3-1). Zusätzlich zu der Bestimmung der Mehrfachbanden war die 1D-Analyse zum Verifizieren kleinster Banden unter 75 bp Größe hilfreich. Allerdings konnten auch mit dieser Methode in manchen Fällen kleinste Banden nicht eindeutig nachgewiesen und bestimmt werden.

### 3.1.3.1.3 Berechnungen der Summen der Restriktionsfragmentlängen der Hydrolysen

Bei den Auswertungen der RFLP-Muster wurde die Summe der Fragmentlängen jeder einzelnen Hydrolyse mit den in CAM bestimmten bp-Werten des zugehörigen Gelbildes errechnet, um die vollständige Erfassung aller Fragmente zu prüfen. Auch wurde zur Absicherung der Ergebnisse der densitometrischen Analysen immer ein Vergleich mit der Summe der Fragmentlängen durchgeführt. Die Größen aller Fragmente, ihre Summen sowie die zugehörigen PCR-Produktgrößen sind für die im vorhergehenden Kapitel dargestellten densitometrischen Analysen zum Nachweis von Mehrfachbanden in Tab.3.1.3.1.3-1 und -2 aufgelistet.

**Tab.3.1.3.1.3-1: Summe der Fragmentlängen: Absicherung einer Doppelbande.**  
*Hinf I-Analyse von Stamm FO 31777 (siehe auch Abb.3.1.3.1.2-1).*

Peak/Bande	bp-Wert
1	760
2	489
Doppelbande 3	2x 420
4	306
5	195
6	77
7	60
<b>Summe der Fragmentlängen</b>	<b>2.727</b>
<b>PCR-Produktgrößenklasse</b>	<b>2.8 kb</b>
<b>PCR-Größe nach CAM (Anhang V)</b>	<b>2.744-2.957</b>

**Tab.3.1.3.1.3-2: Summe der Fragmentlängen: Absicherung einer Dreifachbande.**  
*Hinf I-Analyse von Stamm PB 5635 (siehe auch Abb.3.1.3.1.2-2).*

Peak/Bande	bp-Wert
1	492
Dreifachbande 2	3x 418
3	330
4	308
5	195
6	122
7	77
8	60
<b>Summe der Fragmentlängen</b>	<b>2.838</b>
<b>PCR-Produktgrößenklasse</b>	<b>2.9 kb</b>
<b>PCR-Größe nach CAM (Anhang V)</b>	<b>2.868-3.161</b>

Ebenso müssen auch die Summen der Fragmentgrößen für PCR-Produkte eines Stammes nach Hydrolyse mit verschiedenen Enzymen gleich sein. Beispielhaft ist dies für die zwei internen Standards in Tab.3.1.3.1.3-3 gezeigt. Bei Stamm RBF 729 ist eine maximale Differenz von 342 bp festzustellen, bei Stamm PB 1834 sind es 260 bp. Dies entspricht einem Unterschied (= Differenz/Minimalwert) von rund 12% bzw. 11% und liegt damit in der Größenordnung der Ungenauigkeiten der kb-Bestimmung mit CAM.

**Tab.3.1.3.1.3-3: Summe der Restriktionsfragmentlängen bei Hydrolysen mit verschiedenen Enzymen.** Stamm RBF 729: 2.9 kb PCR-Produktgrößenklasse, PCR-Größe nach CAM 2.839-2.995 bp (Anhang V). Stamm PB 1834: 2.5 kb PCR-Produktgrößenklasse, PCR-Größe nach CAM 2.640-2.749 bp (Anhang V). Zugehörige Fragmente: siehe Anhang X.

	<b>RBF 729</b>	<b>PB 1834</b>
<b><i>Ava</i> II</b>	3.134	2.635
<b><i>Cfo</i> I</b>	2.985	2.527
<b><i>Hae</i> III</b>	2.865	2.513
<b><i>Hinf</i> I</b>	2.798	2.461
<b><i>Msp</i> I</b>	3.099	2.540
<b><i>Taq</i> I</b>	2.792	2.375

### 3.1.3.2 Gruppierung der Stämme nach übereinstimmenden RFLP-Mustern

#### 3.1.3.2.1 Die sechs Restriktionsenzyme differenzieren 20 RFLP-Gruppen

Die RFLP-Analysen der PCR-Produkte des 5'-Bereichs der 26S rDNA von 47 *Exobasidium*-Stämmen mit sechs Restriktionsenzymen ergaben über alle Enzyme gesehen 20 unterschiedliche RFLP-Muster. Die Übereinstimmung in den RFLP-Mustern wurde zur Zuordnung der *Exobasidium*-Stämme zu sogenannten RFLP-Gruppen genutzt (Tab. 3.1.3.2.1-1). Stämme mit bei allen sechs Restriktionsenzymen übereinstimmenden RFLP-Mustern wurden in einer RFLP-Gruppe zusammengefaßt. Schon Unterschiede im RFLP-Muster auch nur eines einzigen Enzyms resultierten in der Definition einer eigenständigen RFLP-Gruppe.

**Tab.3.1.3.2.1-1: Gruppierung der *Exobasidium*-Stämme nach Identität der RFLP-Muster über alle sechs Restriktionsenzyme.** Die 20 RFLP-Gruppen (= RFLP-Gr.) sind nach den PCR-Produktgrößenklassen sortiert. Die Gruppen I bis XIV wurden bei BLANZ & DÖRING (1995) vorgestellt - ihre Benennung wird hier beibehalten.

RFLP-Gr.	Stamm	Wirt		Befallsbild
<b>2.2 kb PCR-Produktgrößenklasse</b>				
<b>I</b>	PB 383	<i>E. vaccinii</i>	<i>V. uliginosum</i>	lokal
	PB 393 = RBF 1008	<i>E. vaccinii</i>	<i>V. vitis-idaea</i>	lokal
	PB 3276	<i>E. oxycocci</i>	<i>V. oxycoccos</i>	systemisch
<b>VI</b>	RBF 726	<i>E. juelianum</i>	<i>V. vitis-idaea</i>	systemisch
<b>VII</b>	PB 2857 e	<i>E. rhododendri</i>	<i>Rh. x intermedium</i>	lokal
	PB 4898-7	<i>E. rhododendri</i>	<i>Rh. spec.</i>	lokal
	PB 4898-19	<i>E. rhododendri</i>	<i>Rh. spec.</i>	lokal
<b>IX</b>	PB 5634	<i>E. rhododendri</i>	<i>Rh. x intermedium</i>	lokal
<b>X</b>	FO 24040-3	<i>E. rhododendri</i>	<i>Rh. ferrugineum</i>	lokal
<b>XI</b>	FO 31767	<i>E. rhododendri</i>	<i>Rh. ferrugineum</i>	lokal
	PB 4381	<i>E. rhododendri</i>	<i>Rh. hirsutum</i>	lokal
<b>2.5 kb PCR-Produktgrößenklasse</b>				
<b>V</b>	CBS 183.56	<i>E. vaccinii</i>	<i>V. vitis-idaea</i>	systemisch
	FO 31761	<i>E. myrtilli</i>	<i>V. vitis-idaea</i>	
	PB 394	<i>E. myrtilli</i>	<i>V. vitis-idaea</i>	systemisch
	PB 1834	<i>E. myrtilli</i>	<i>V. vitis-idaea</i>	lokal
	PB 3385	<i>E. myrtilli</i>	<i>V. vitis-idaea</i>	systemisch
	PB 4143	<i>E. myrtilli</i>	<i>V. vitis-idaea</i>	
	RBF 727	<i>E. juelianum</i>	<i>V. vitis-idaea</i>	systemisch
	RBF 763	<i>E. vaccinii</i>	<i>V. vitis-idaea</i>	lokal
	RBF 765	<i>E. vaccinii</i>	<i>V. vitis-idaea</i>	lokal
	<b>2.6 kb PCR-Produktgrößenklasse</b>			
<b>III</b>	PB 1828	<i>E. vaccinii</i>	<i>V. myrtillus</i>	lokal
<b>IV</b>	FO 31778	<i>E. vaccinii</i>	<i>V. uliginosum</i>	lokal
	PB 4153	<i>E. vaccinii</i>	<i>V. uliginosum</i>	lokal
<b>VIII</b>	FO 24040-2	<i>E. rhododendri</i>	<i>Rh. ferrugineum</i>	lokal
	PB 4163	<i>E. rhododendri</i>	<i>Rh. ferrugineum</i>	lokal
	PB 4380	<i>E. rhododendri</i>	<i>Rh. ferrugineum</i>	lokal
	CBS 240.50	<i>E. rhododendri</i>	<i>Rh. hirsutum</i>	
<b>XII</b>	CBS 157.85	<i>E. shiraianum</i>	<i>Rh. degronianum</i>	
<b>XIII</b>	PB 3684	<i>E. japonicum</i>	<i>Rh. indicum</i> cult.	lokal
	PB 4898-17	<i>E. rhododendri</i>	<i>Rh. spec.</i>	lokal
<b>XIV</b>	RBF 724	<i>E. japonicum</i>	<i>Rh. indicum</i>	
<b>XV</b>	RBF 737	<i>E. pachysporum</i>	<i>V. uliginosum</i>	lokal
<b>XVI</b>	CBS 153.85 = RBF 725	<i>E. japonicum</i>	<i>Rh. indicum</i>	
<b>XVII</b>	PB 4864-3	<i>E. rhododendri</i>	<i>Menz. ferruginea</i>	lokal
	PB 4864-4	<i>E. rhododendri</i>	<i>Menz. ferruginea</i>	lokal
<b>2.8 kb PCR-Produktgrößenklasse</b>				
<b>II</b>	PB 3277	<i>E. vaccinii</i>	<i>V. macrocarpum</i>	lokal
	FO 31777	<i>E. vaccinii</i>	<i>V. oxycoccos</i>	lokal
	PB 3275	<i>E. vaccinii</i>	<i>V. oxycoccos</i>	lokal
	RBF 746	<i>E. rostrupii</i>	<i>V. oxycoccos</i>	lokal
<b>2.9 kb PCR-Produktgrößenklasse</b>				
<b>XVIII</b>	PB 4864-2	<i>E. rhododendri</i>	<i>Menz. ferruginea</i>	lokal
<b>XIX</b>	PB 5635	<i>E. karstenii</i>	<i>And. polifolia</i>	systemisch
	RBF 729	<i>E. karstenii</i>	<i>And. polifolia</i>	systemisch
	RBF 732	<i>E. karstenii</i>	<i>And. polifolia</i>	systemisch
	RBF 733	<i>E. karstenii</i>	<i>And. polifolia</i>	systemisch
<b>XX</b>	CBS 156.85	<i>E. reticulatum</i>	<i>Thea sinensis</i>	

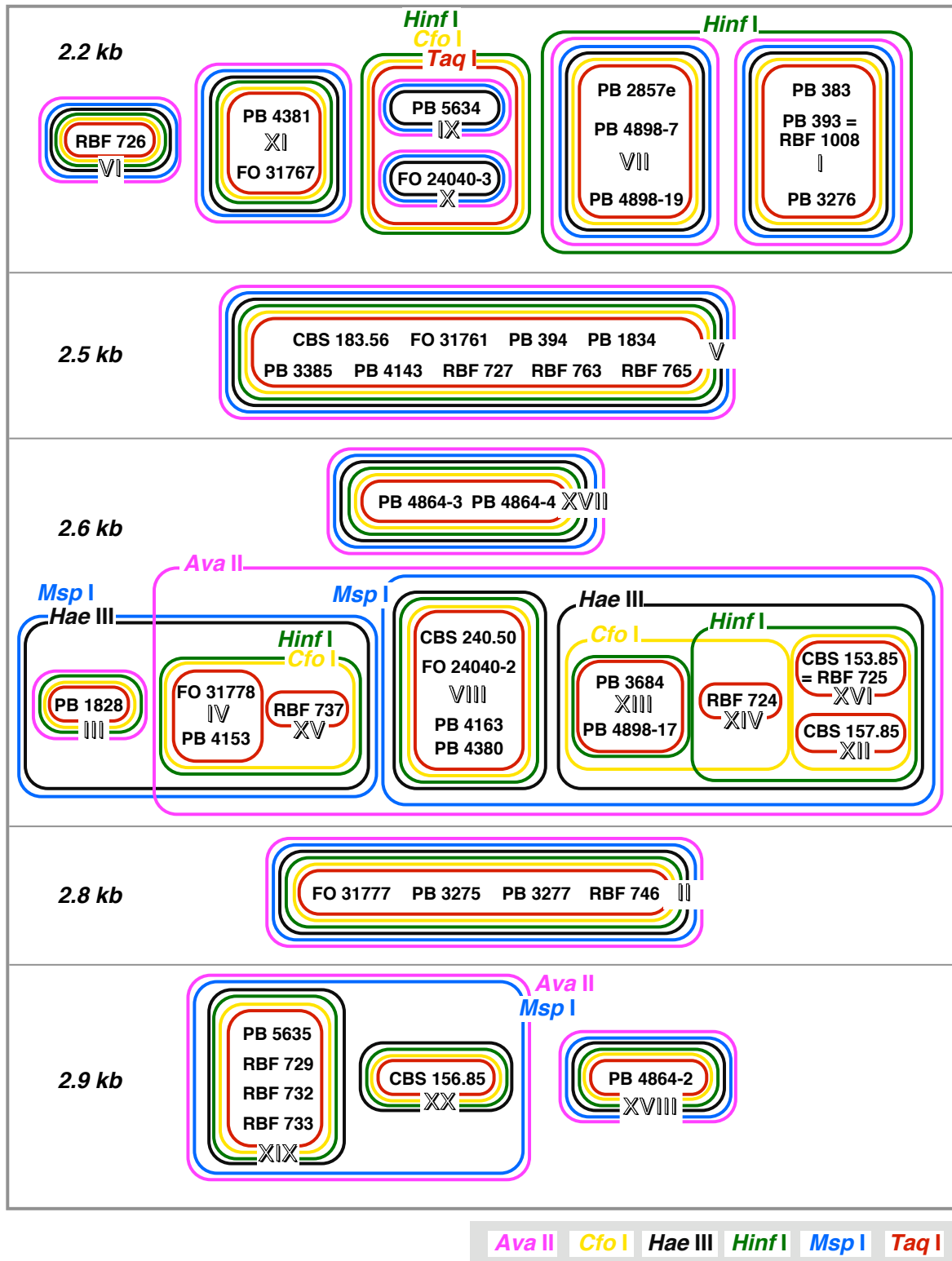
Von den 51 erfolgreich amplifizierten Stämmen wurden 47 mit RFLPs analysiert; von den 'Einsporkulturen' von PB 4898 wurden nur drei repräsentative Vertreter hierfür ausgewählt. Unter den 47 Stämmen waren auch die zwei *Exobasidium*-Isolate mit jeweils zwei getrennt in verschiedenen Stammsammlungen gehaltenen Kulturen. Die zwei zusammengehörigen Kulturen PB 393 und RBF 1008 sowie CBS 153.85 und RBF 725 zeigten jeweils übereinstimmende RFLP-Muster. Auch die unabhängig voneinander durchgeführten Hydrolysen von PCR-Produkten der als interne Standards verwendeten Stämme RBF 729 und PB 1834 zeigten immer identische RFLP-Muster.

Unterschiedliche Längen der PCR-Produkte müssen sich in mindestens einem unterschiedlich großen Fragment ihrer RFLP-Muster niederschlagen. Daher gibt es keine RFLP-Gruppen, die übergreifend über die PCR-Produktgrößenklassen sind. In drei der Größenklassen (2.2, 2.6 und 2.9 kb) findet sich eine Unterteilung in mehrere RFLP-Gruppen. Auffallend ist die Vielzahl an RFLP-Gruppen im Verhältnis zur Zahl analysierter Stämme. 10 der 45 analysierten unterschiedlichen Stämme zeigen ein einzigartiges RFLP-Muster über alle sechs Enzyme und bilden so jeweils eine eigene RFLP-Gruppe. Insbesondere die von *Rhododendron* spp. und *Menziesia ferruginea* isolierten Stämme zerfallen in verschiedene RFLP-Gruppen, die dann z.T. aber auch Stämme von unterschiedlichen Wirtsarten vereinigen (VII, VIII, XI, XIII). Bei den von *Vaccinium* spp. isolierten Stämmen gibt es ebenfalls zwei RFLP-Gruppen, die Stämme von verschiedenen Wirten beinhalten (I, II). In Bezug auf das Befallsbild sind die meisten RFLP-Gruppen einheitlich, aber bei zwei RFLP-Gruppen gibt es Stämme, die auf Vaccinien unterschiedliche Befallsbilder auslösen (I, V). Besonders zu beachten ist die Tatsache, daß die von einer infizierten Pflanze parallel oder als 'Einsporkulturen' gewonnen Stämme in allen drei Fällen (PB 4864, PB 4898, FO 24040/PB 4163) keine einheitliche Gruppe bilden, sondern daß sie sich jeweils auf zwei RFLP-Gruppen in unterschiedlichen PCR-Produktgrößenklassen verteilen. Um die Bedeutung dieser Befunde genauer bewerten und eine Interpretation der RFLP-Gruppen - auch im Zusammenhang mit weiteren Charakteristika der Stämme wie beispielsweise den GC-Werten - vornehmen zu können, werden zunächst die der Gruppeneinteilung zugrunde liegenden RFLP-Muster und die Differenzierung aufgrund der einzelnen Enzyme genauer beschrieben.

#### 3.1.3.2.2 Die Restriktionsenzyme differenzieren und gruppieren unterschiedlich

Die RFLP-Gruppen I bis XX sind durch Unterschiede im RFLP-Muster über alle sechs verwendeten Enzyme gesehen definiert. Keines der sechs Enzyme kann allerdings diese 20 Gruppen alleine differenzieren. Nur durch gegenseitige Unterteilungen und Überschneidungen der RFLP-Muster der einzelnen Enzyme kommen diese 20 RFLP-Gruppen zustande (Abb.3.1.3.2.2-1).





**Abb.3.1.3.2.2-1: Differenzierung und Gruppierung der *Exobasidium*-Stämme aufgrund der RFLP-Muster der einzelnen Restriktionsenzyme.** Die Gruppierungen für die sechs Enzyme sind farbig dargestellt und nach PCR-Produktgrößenklassen angeordnet.

*Taq* I zeigt insgesamt 19 RFLP-Muster, nur die RFLP-Gruppen IX und X werden nicht durch dieses Enzym unterschieden. *Ava* II und *Msp* I bilden hingegen jeweils nur 13 Gruppierungen, bei *Hae* III und *Hinf* I sind es 15 und bei *Cfo* I 16. Es zeigt sich, daß es nur sechs RFLP-Gruppen gibt, die von allen Enzymen einheitlich umschrieben werden (VI, XI, V, XVII, II und XVIII). Bei sechs weiteren RFLP-Gruppen in der 2.2 kb- und der 2.9 kb-Größenklasse sind die durch einige Enzyme gebildeten, größeren Gruppierungen durch mehrere andere Enzyme gleichsinnig unterteilt (IX-X, VII-I, XIX-XX). Bei den verbleibenden acht RFLP-Gruppen in der 2.6 kb-Größenklasse sind die Verhältnisse hingegen komplexer. Einerseits differenziert das *Taq* I-Muster in zwei Fällen RFLP-Gruppen als einziges Enzym (IV-XV, XVI-XII), und zum anderen kommt es hier zu Überschneidungen zwischen den Gruppierungen einzelner Enzyme. Die RFLP-Gruppen IV und XV zeigen bei Hydrolysen mit *Hae* III und *Msp* I übereinstimmende Restriktionsmuster mit RFLP-Gruppe III, während sie bei Hydrolysen mit *Ava* II von dieser verschieden und statt dessen mit den RFLP-Gruppen VIII, XIII, XIV, XVI und XII identisch sind. Und RFLP-Gruppe XIV zeigt in ihrem *Cfo* I-Muster Übereinstimmung mit RFLP-Gruppe XIII, bei ihrem *Hinf* I-Muster jedoch mit den RFLP-Gruppen XVI und XII. Bei den 10 RFLP-Gruppen, die nur von einem einzigen Stamm gebildet werden, sind nur die Stämme RBF 726 und PB 4864-2 wirklich durch singuläre RFLP-Muster bei allen sechs Enzymen differenziert, während die Stämme RBF 737, CBS 153.85 und CBS 157.85 hingegen genauso wie RFLP-Gruppe IV nur durch ihr *Taq* I-Muster differenziert werden.

### 3.1.3.3 Die 0/1-Matrix der RFLP-Muster und die Homologisierung von Restriktionsfragmenten zwischen unterschiedlichen RFLP-Mustern

Die 20 RFLP-Muster wurden in einer 0/1-Matrix zusammengefaßt, die das Vorhandensein bzw. Fehlen jedes einzelnen Fragmentes pro Restriktionsenzym und RFLP-Gruppe wiedergibt (Tab.3.1.3.3-1). Die Matrix enthält insgesamt 177 Banden, wobei die Anzahl an Banden bei jedem Restriktionsenzym der Gesamtzahl an unterschiedlichen Fragmenten entspricht, welche bei den Hydrolysen mit diesem Enzym bei allen Stämmen zusammen gefunden wurden (*Ava* II 24, *Cfo* I 29, *Hae* III 36, *Hinf* I 32, *Msp* I 25, *Taq* I 31). Bei den Hydrolysen der PCR-Produkte einzelner Stämme liegt die Zahl entstandener Restriktionsfragmente entsprechend niedriger (*Ava* II 5-8, *Cfo* I 4-7, *Hae* III 7-11, *Hinf* I 7-11, *Msp* I 5-8, *Taq* I 6-10). Die beiden Restriktionsenzyme mit Erkennungssequenzen von fünf Nukleotiden Länge (*Ava* II und *Hinf* I) ergeben praktisch die gleich Zahl an Fragmenten wie die übrigen vier Enzyme mit Erkennungssequenzen von vier Nukleotiden Länge. Auch ist im allgemeinen keine größere Zahl an Fragmenten bei den RFLP-Gruppen der größeren PCR-Produktgrößenklassen festzustellen.

Die Homologisierung von Fragmenten unterschiedlicher RFLP-Muster hat keinerlei Auswirkung auf die bisher dargestellte Zuordnung von Stämmen zu RFLP-Gruppen, da diese nur auf der absoluten Übereinstimmung der RFLP-Muster beruht, aber sie ist Grundlage für die folgenden Berechnungen der Ähnlichkeiten zwischen den verschiedenen RFLP-Mustern bzw. -Gruppen. Die Homologisierung der Fragmente der Mehrfachbanden mit Fragmenten anderer RFLP-Muster wird im folgenden erläutert, da in einigen Fällen hierbei alternative Homologisierungen denkbar sind. Die Homologisierungen bei der Erstellung der 0/1-Matrix wurden immer so durchgeführt, daß möglichst wenige zusätzliche Merkmale in die Matrix eingefügt werden mußten.

In den Fällen, in denen im Größenbereich einer Mehrfachbande in anderen RFLP-Mustern nur Fragmente einer einheitlichen Größe festzustellen waren, wurden diese als gleich groß ermittelten Fragmente verschiedener RFLP-Muster untereinander und mit nur einem einzigen Fragment der Mehrfachbanden homologisiert. Da es keinen Anhaltspunkt für eine Aufteilung der als gleich groß ermittelten Fragmente der verschiedenen RFLP-Muster gibt, erscheinen die weiteren Fragmente der Mehrfachbanden hier als zusätzliche Merkmale in der Matrix, und alle Fragmente der Mehrfachbanden werden als gleich groß betrachtet (z.B. alle Mehrfachbanden bei *Hae* III und *Msp* I). In anderen Fällen ergab sich hingegen eine mögliche Homologisierung der Fragmente von Mehrfachbanden mit geringfügig unterschiedlich großen Fragmenten mehrerer anderer RFLP-Muster, die an sich schon als mehrere Merkmale in der Matrix kodiert wurden. Dies wurde als Hinweis auf eine unterschiedliche Größe der in diesen Mehrfachbanden enthaltenen Fragmente gewertet (z.B. alle Mehrfachbanden bei *Ava* II und *Hinf* I). Wenn zwei geringfügig unterschiedlich große Fragmente verschiedener RFLP-Muster mit einer Doppelbande und mit einer Dreifachbande anderer RFLP-Muster zu homologisieren waren (*Hinf* I Banden 13-15), gab es unterschiedliche gleichwertige Möglichkeiten. Es wurden hier die beiden ungleich großen Einzelfragmente mit den beiden Fragmenten der Doppelbande und zwei Fragmenten der Dreifachbande homologisiert, womit nur deren drittes Fragment als zusätzliches Merkmal in die Matrix eingefügt ist. Meist war die Homologisierung hingegen relativ eindeutig, da zwei Fragmente auf eine Doppelbande bzw. drei auf eine Dreifachbande aufzuteilen waren (*Cfo* I Banden 7+8, *Hinf* I 24+25, *Taq* I 25+26, 30+31, *Ava* II Banden 19-21).

---

**Tab.3.1.3.3-1: 0/1-Matrix der RFLP-Muster der *Exobasidium*-Stämme.** Die Matrix ist für die 20 RFLP-Gruppen angelegt. Die Auflistung der Fragmente ist nach Enzymen unterteilt, die Fragmente sind pro Enzym numeriert, und ihre Größe ist angegeben. In der Kopfzeile jedes Enzyms sind die RFLP-Gruppen markiert, die bei dem jeweiligen Enzym identische RFLP-Muster besitzen. Über die 1D-Analyse nachgewiesene Mehrfachbanden sind durch Schattierung hervorgehoben.

RFLP-Gruppe		XI	IX	X	VII	I	VI	V	III	IV	XV	VIII	XIII	XIV	XVI	XII	XVII	II	XIX	XX	XVIII
PCR-Produkt-Größenklasse		2.2 kb						2.5	2.6 kb									2.8	2.9 kb		
Ava II																					
Nr.	bp	XI	IX	X	VII	I	VI	V	III	IV	XV	VIII	XIII	XIV	XVI	XII	XVII	II	XIX	XX	XVIII
1	1.900	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
2	1.550	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
3	1.530	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
4	1.510	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	1.420	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	1.250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
7	1.025	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	620	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	530	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	515	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11	430	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	410	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	260	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
14	215	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
15	210	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	195	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
17	190	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
18	170	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	160	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20	155	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
21	150	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
22	140	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	85	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	70	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fragmentzahl		6	6	7	7	7	7	6	7	6	6	6	6	6	6	6	6	8	6	6	5
Summe der Fragmentlängen		2.220	2.235	2.285	2.260	2.205	2.095	2.595	2.755	2.725	2.725	2.725	2.725	2.725	2.725	2.725	2.745	2.875	3.075	3.075	2.940

Cfo I																					
Nr.	bp	XI	IX	X	VII	I	VI	V	III	IV	XV	VIII	XIII	XIV	XVI	XII	XVII	II	XIX	XX	XVIII
1	1.480	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
2	1.060	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
3	880	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
4	880	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	820	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
6	780	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	645	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	625	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	605	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1
10	605	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
11	595	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	570	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
13	500	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	455	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
15	455	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	445	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
17	400	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
18	325	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	315	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
20	270	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
21	265	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
22	250	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	215	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	215	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	180	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	150	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	145	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
28	120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	100	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Fragmentzahl		4	5	5	5	6	5	5	6	4	4	7	5	5	4	4	5	7	7	4	5
Summe der Fragmentlängen		2.210	2.195	2.195	2.200	2.200	1.955	2.555	2.620	2.680	2.680	2.600	2.645	2.645	2.645	2.645	2.675	2.805	2.975	3.065	2.950

<i>Hae III</i>																					
Nr.	bp	XI	IX	X	VII	I	VI	V	III	IV	XV	VIII	XIII	XIV	XVI	XII	XVII	II	XIX	XX	XVIII
1	1.580	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
2	1.150	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	1.100	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	
4	1.020	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	
5	845	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
6	665	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
7	610	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
8	600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
9	560	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
10	560	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
11	480	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
12	430	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
13	390	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
14	375	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
15	350	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
16	315	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
17	310	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
18	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
19	250	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
20	230	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	
21	230	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
22	190	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
23	175	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	
24	140	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
25	120	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
26	120	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
27	120	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
28	110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
29	105	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
30	105	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
31	90	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
32	60	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
33	55	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	

34	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
35	40	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
36	40	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fragmentzahl		7	7	8	10	11	9	9	9	9	9	8	9	9	9	9	8	10	10	9	8
Summe der Fragmentlängen		2.190	2.240	2.185	2.275	2.205	2.045	2.520	2.585	2.585	2.585	2.735	2.655	2.655	2.655	2.655	2.685	2.810	2.895	2.940	2.865
<b>Hinf I</b>																					
<b>Nr.</b>	<b>bp</b>	<b>XI</b>	<b>IX</b>	<b>X</b>	<b>VII</b>	<b>I</b>	<b>VI</b>	<b>V</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>XV</b>	<b>VIII</b>	<b>XIII</b>	<b>XIV</b>	<b>XVI</b>	<b>XII</b>	<b>XVII</b>	<b>II</b>	<b>XIX</b>	<b>XX</b>	<b>XVIII</b>
1	1.060	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	930	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	850	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
4	760	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
5	610	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	580	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
7	570	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	550	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
9	505	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	490	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
11	465	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
12	450	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
13	425	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
14	420	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
15	415	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
16	385	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	345	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
18	335	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	330	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
20	300	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
21	250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
22	240	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	195	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	190	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
25	185	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
26	145	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
27	125	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
28	115	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

29	100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	80	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
31	50	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
32	30	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fragmentzahl		7	7	7	8	8	8	7	9	8	8	9	9	8	8	8	8	8	10	11	8
Summe der Fragmentlängen		2.115	2.145	2.145	2.120	2.120	2.225	2.465	2.485	2.525	2.525	2.535	2.525	2.530	2.530	2.530	2.560	2.715	2.825	2.855	2.965
<b>Msp I</b>																					
<b>Nr.</b>	<b>bp</b>	<b>XI</b>	<b>IX</b>	<b>X</b>	<b>VII</b>	<b>I</b>	<b>VI</b>	<b>V</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>XV</b>	<b>VIII</b>	<b>XIII</b>	<b>XIV</b>	<b>XVI</b>	<b>XII</b>	<b>XVII</b>	<b>II</b>	<b>XIX</b>	<b>XX</b>	<b>XVIII</b>
1	2.230	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2	1.760	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
3	1.650	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
4	1.330	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
5	1.300	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	1.260	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	1.200	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	1.100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
9	890	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
10	800	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	555	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	515	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
13	445	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	420	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	260	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	240	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
17	230	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	190	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
19	160	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20	130	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	120	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	55	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	45	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
24	45	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	35	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fragmentzahl		5	5	5	7	8	5	5	6	6	6	5	5	5	5	5	5	6	6	6	5
Summe der Fragmentlängen		2.210	2.250	2.260	2.250	2.265	2.200	2.650	2.715	2.715	2.715	2.600	2.600	2.600	2.600	2.600	2.710	2.845	2.990	2.990	3.180



Taq I																					
Nr.	bp	XI	IX	X	VII	I	VI	V	III	IV	XV	VIII	XIII	XIV	XVI	XII	XVII	II	XIX	XX	XVIII
1	1.400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
2	1.100	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
3	1.050	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	780	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
5	700	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	650	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
7	630	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	590	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
9	515	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	515	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
11	515	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
12	400	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	385	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14	370	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	350	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
16	330	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	275	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
18	255	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	250	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	240	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
21	230	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	205	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
23	175	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
24	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
25	145	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
26	140	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
27	135	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
28	130	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
29	130	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
30	120	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
31	115	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fragmentzahl		8	7	7	7	7	6	8	8	8	8	8	7	9	9	8	9	7	8	9	10
Summe der Fragmentlängen		2.070	2.090	2.090	2.185	2.215	2.215	2.380	2.385	2.615	2.560	2.655	2.565	2.480	2.515	2.690	2.380	2.860	2.785	2.655	2.670

Ungenauigkeiten wie vereinzelte Homologisierungsprobleme oder auch Unsicherheit über das Auftreten kleinster Fragmente sind nicht vermeidbar. Mit den durchgeführten mehrfachen und wechselseitigen Kontrollen der RFLP-Muster und ihrer Homologisierungen, auch im Vergleich mit den PCR-Produktgrößen und durch die 1D-Analysen, ist bei den zugrunde liegenden Daten der PCR-RFLP-Gelbilder keine weitere Verbesserung der 0/1-Matrix mehr möglich. Im folgenden werden auf Grundlage dieser Matrix die Ähnlichkeiten zwischen den RFLP-Gruppen ermittelt und in Beziehung zu bekannten Charakteristika der untersuchten *Exobasidium*-Stämme gesetzt.

#### 3.1.3.4 Ähnlichkeitsanalyse der RFLP-Muster

Die RFLP-Muster der 0/1-Matrix (siehe Tab.3.1.3.3-1) wurden mit Distanz- und Parsimony-Verfahren derart analysiert, daß auch ohne die Berücksichtigung von Außengruppen gewurzelte Dendrogramme entstehen. Es mußte daher keine der RFLP-Gruppen als Außengruppe definiert werden. Bei der UPGMA-Clusterung der auf nach NEI & LI (1979) berechneten Ähnlichkeitswerten beruhenden Distanzmatrix (siehe Anhang XI) traten keine „ties“ auf. Das Clusterverfahren resultierte in einem einzigen Dendrogramm mit einer kophenetischen Korrelation von  $r = 0,96324$  (Abb.3.1.3.4-1). In der Parsimony-Analyse mit asymmetrischer Schrittmatrix ( $0 \rightarrow 1 = 4$  Schritte,  $1 \rightarrow 0 = 1$  Schritt) werden alle variablen Merkmale verrechnet. Die 177 Merkmale umfassende 0/1-Matrix enthält drei konstante Merkmale (Merkmalszustand 1) und 174 variable Merkmale, von denen bei Wagner- oder Fitch-Parsimony 99 parsimony-informativ und 75 parsimony-uninformativ wären. Die Parsimony-Analyse ergab zwei gleich sparsamste Bäume mit einer Gesamtlänge von 626 Schritten. Der Consensus aus beiden Dendrogrammen (Abb.3.1.3.4-2) ist gut aufgelöst, da sich nur die Beziehungen der RFLP-Gruppen IX, X und XI zueinander in den beiden Dendrogrammen unterschiedlich darstellen.

Das UPGMA- und das Parsimony-Dendrogramm der PCR-RFLP-Daten zeigen Ähnlichkeiten zwischen den RFLP-Mustern bestimmter RFLP-Gruppen auf, die bei beiden Verfahren zusammen gruppiert werden (in Abb.3.1.3.4-1 und -2 grau unterlegt). Die Beziehungen dieser Cluster zueinander werden jedoch je nach Verfahren z.T. unterschiedlich dargestellt, und auch die RFLP-Gruppen II und V werden in beiden Dendrogrammen an andere RFLP-Gruppen angeschlossen. Die Ähnlichkeitsanalysen ergeben ein „Hauptcluster“ an RFLP-Gruppen, die nach Distanzwerten zueinander alle mindestens um 60% Ähnlichkeit aufweisen. Innerhalb dieses „Hauptclusters“ nimmt das Cluster der RFLP-Gruppen XIX und XX mit Stämmen von *Thea sinensis* und *And. polifolia* eine basale Stellung ein. Nur die RFLP-Gruppen I, VI und VII stehen isoliert und zeigen deutlich geringere Ähnlichkeiten zu den RFLP-Gruppen dieses „Hauptclusters“ (um 30%).

In Abb.3.1.3.4-1 und -2 sind neben den Dendrogrammen die Charakteristika der RFLP-Gruppen und *Exobasidium*-Stämme angetragen. Vergleicht man die Gruppierungen in den Dendrogrammen mit den PCR-Produktgrößenklassen und Wirtspflanzen, so ergibt sich folgendes Bild:

- \* Gerade die zwei einzelnen RFLP-Gruppen in der 2.5 kb-Größenklasse (V) und der 2.8 kb-Größenklasse (II) sind es, die sich nicht eindeutig an RFLP-Gruppen anderer Größenklassen anschließen.
- \* Die verschiedenen RFLP-Gruppen der 2.2 kb-Größenklasse teilen sich in beiden Dendrogrammen in zwei Cluster auf. Eine Gruppierung mit Stämmen von *Rhododendron* spp. (IX, X, XI) findet sich innerhalb des „Hauptclusters“, während die andere die isoliert stehenden RFLP-Gruppen I, VI und VII mit Stämmen von *Rhododendron* spp. und *Vaccinium* spp. umfaßt.
- \* Auch die RFLP-Gruppen der 2.6 kb-Größenklasse verteilen sich auf mehrere Cluster. Diese drei Cluster entsprechen den Wirtspflanzen. Die RFLP-Gruppen mit Stämmen von *Vaccinium* spp. gruppieren zusammen (III, IV, XV) und diejenigen mit Stämmen von *Rhododendron* spp. (VIII, XII, XIII, XIV, XVI). Nur die Stämme von *Menz. ferruginea* (XVII) gruppieren mit dem anderen Stamm derselben Wirtspflanze aus der 2.9 kb-Größenklasse (XVIII). Die beiden übrigen RFLP-Gruppen der 2.9 kb-Größenklasse mit Stämmen von *And. polifolia* und *Thea sinensis* gruppieren gemeinsam.
- \* Betrachtet man ausschließlich die Wirtspflanzen, so zeigt sich keine Korrelation. Die RFLP-Gruppen mit Wirten aus der Gattung *Rhododendron* finden sich in beiden Dendrogrammen in drei getrennten Clustern, diejenigen mit Wirten aus der Gattung *Vaccinium* sogar in vier.

---

**Abb.3.1.3.4-1: UPGMA-Dendrogramm der RFLP-Gruppen.** Die Clusteranalyse der Ähnlichkeitswerte nach NEI & LI lieferte ein eindeutiges Dendrogramm, kophenetische Korrelation  $r = 0,96324$ . Bei Parsimony-Verfahren (Abb. 3.1.3.4-2) ebenfalls auftretende Cluster sind grau unterlegt. Zum Vergleich sind zusätzliche Charakteristika der Stämme angegeben.

**Abb.3.1.3.4-2: Consensus-Dendrogramm der Parsimony-Analyse der RFLP-Gruppen.** Die Parsimony-Analyse mit asymmetrischer Schrittmatrix lieferte zwei gleich sparsamste Bäume mit einer Länge von 626 Schritten. Bei Distanzmatrix-Verfahren (Abb.3.1.3.4-1) ebenfalls auftretende Cluster sind grau unterlegt. Zum Vergleich sind zusätzliche Charakteristika der Stämme angegeben.

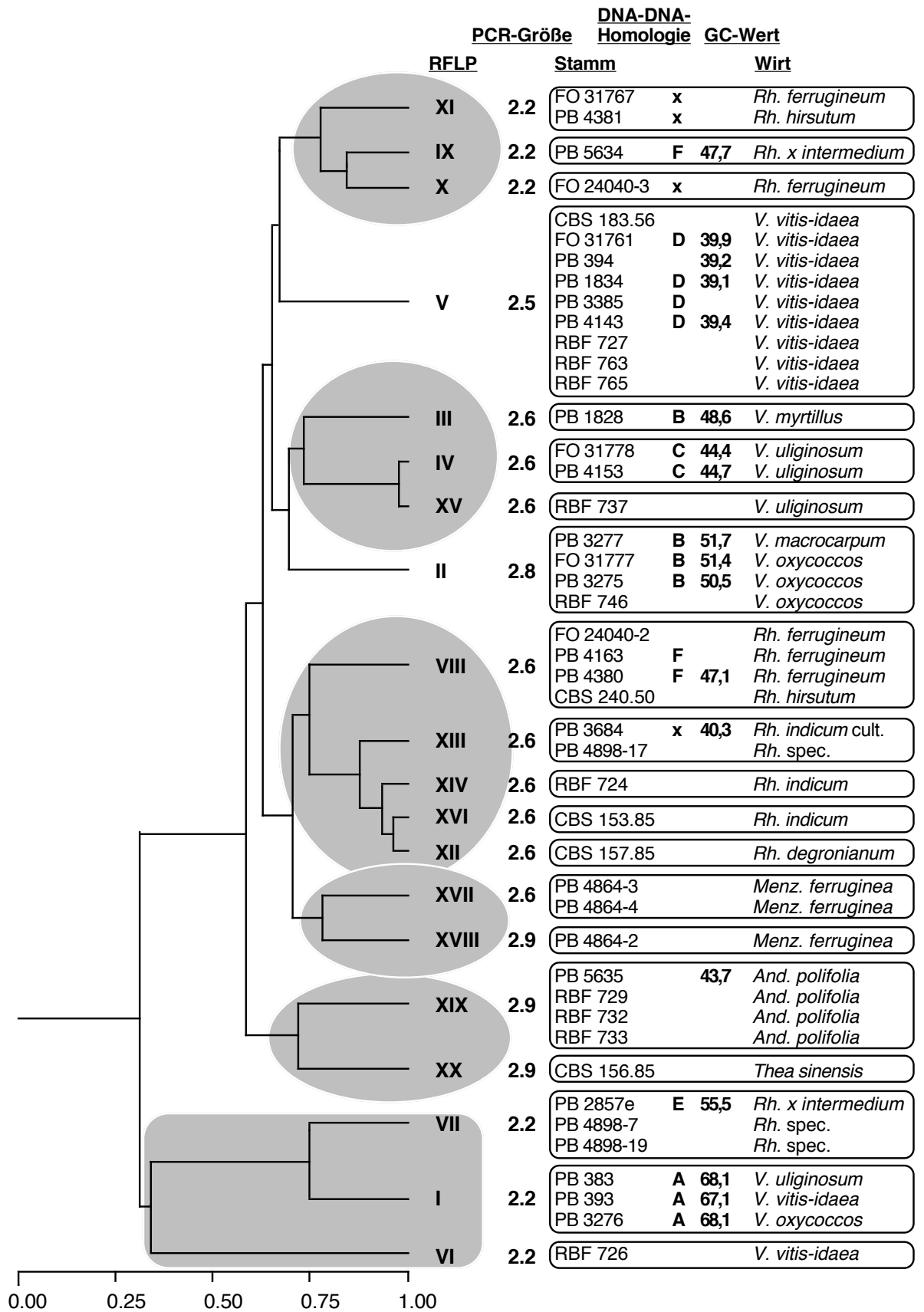


Abb.3.1.3.4-1

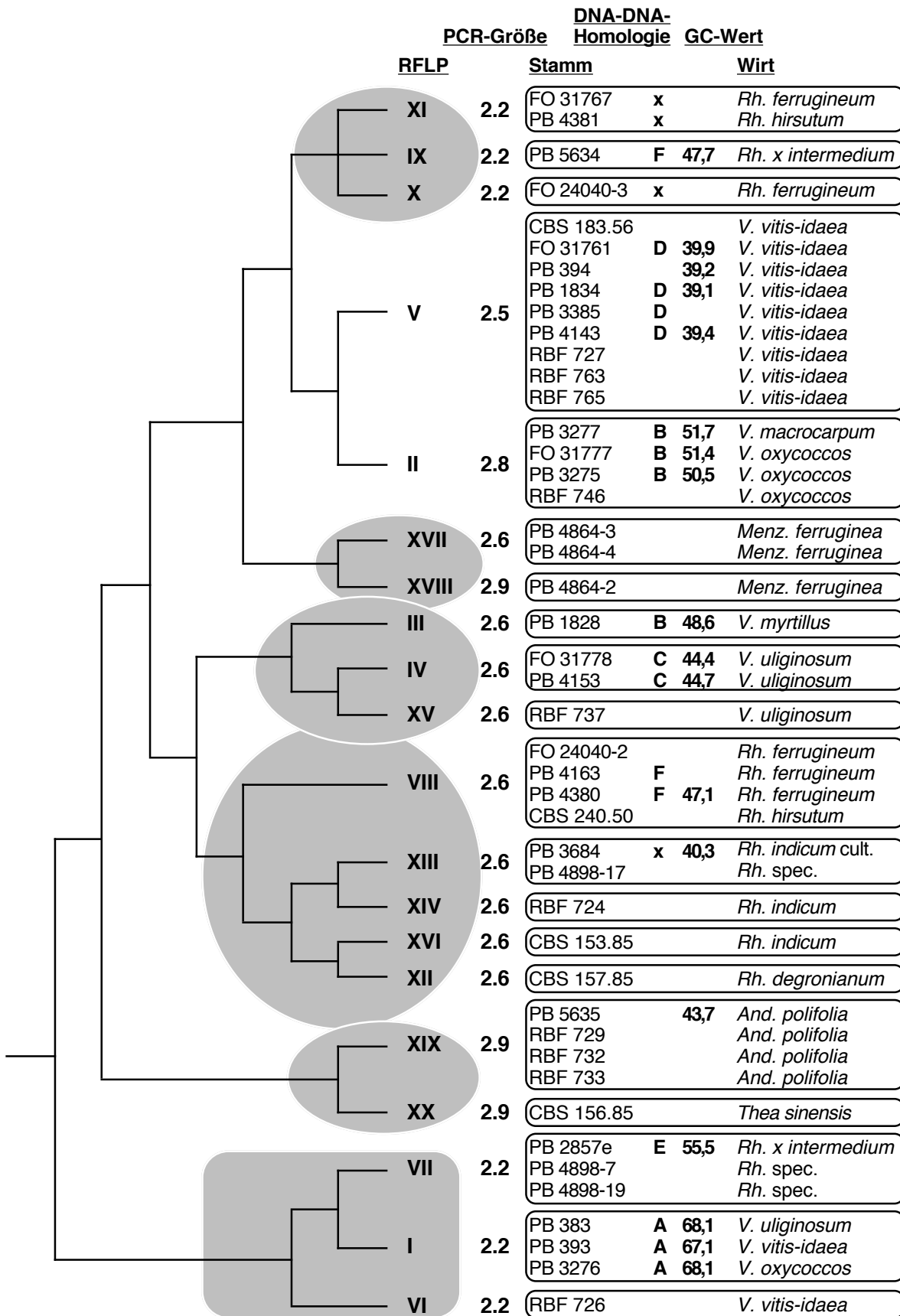
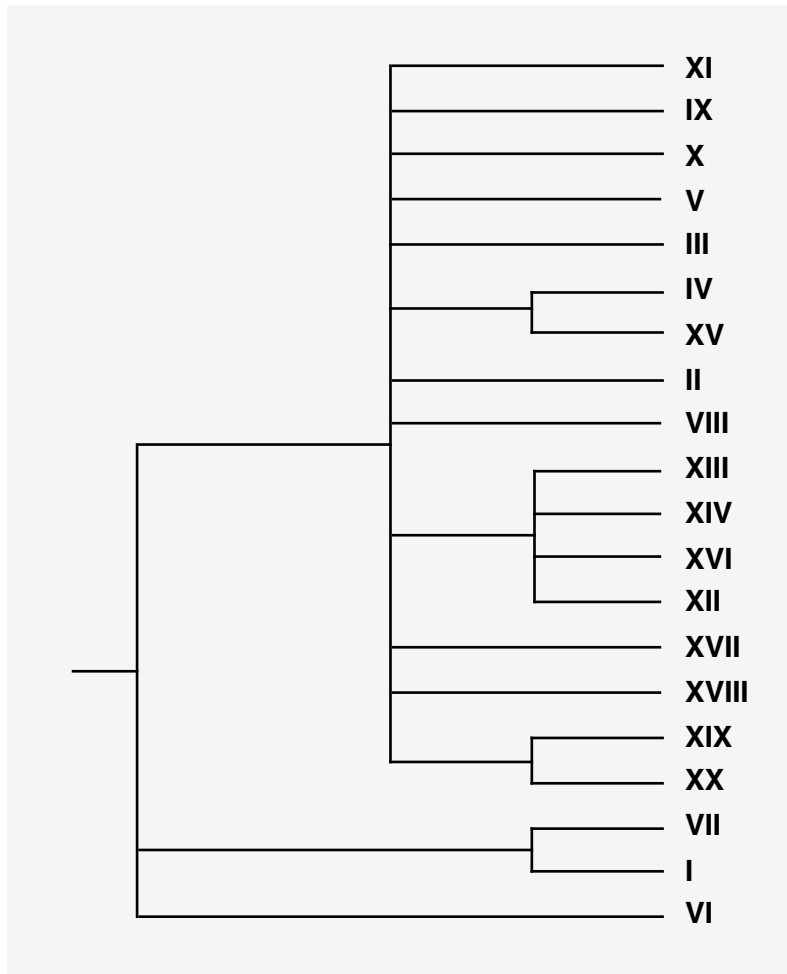


Abb.3.1.3.4-2

Vergleicht man die nach Anhang III und IV an die Dendrogramme angetragenen Zugehörigkeiten zu DNA-DNA-Homologie-Gruppen und die GC-Werte als weitere molekulare Charakteristika der untersuchten Stämme mit den PCR-RFLP-Ergebnissen, so ist festzustellen, daß die RFLP-Gruppen mit den GC-Werten und DNA-DNA-Homologien korrespondieren. Keine RFLP-Gruppe enthält Stämme unterschiedlichen GC-Gehaltes oder mehrerer DNA-DNA-Homologie-Gruppen. Jedoch werden mit den PCR-RFLPs früher als einheitlich betrachtete Stämme differenziert. In zwei Fällen werden über GC-Wert und DNA-DNA-Homologie als konspezifisch charakterisierte Stämme auf zwei RFLP-Gruppen verteilt (DNA-DNA-Homologie-Gruppe B in RFLP-Gruppe III und II, F in IX und VIII). Schon bei der Betrachtung der RFLP-Gruppen war aufgefallen, daß sowohl die parallel von einer infizierten Pflanze isolierten Stämme FO 24040-2, -3 und PB 4163 wie auch die 'Einsporkulturen' von PB 4864 und auch die von PB 4898 keine einheitliche RFLP-Gruppe bilden (siehe Kapitel 3.1.3.2.1). Auffallend ist, daß sich die zwei RFLP-Gruppen von Stämmen, für die eigentlich eine genetische Einheitlichkeit zu erwarten wäre (DNA-DNA-Homologie-Gruppen B und F, 'Einsporkulturen' von PB 4864 und PB 4898), auf unterschiedliche PCR-Produktgrößenklassen verteilen. In den Ähnlichkeitsanalysen ergibt sich dazu folgendes:

- \* Die 'Einsporkulturen' von PB 4864 von *Menz. ferruginea* in den RFLP-Gruppen XIX und XX gruppieren trotz unterschiedlicher PCR-Produktgrößen gemeinsam.
- \* Die 'Einsporkulturen' von PB 4898 von *Rhododendron spec.* hingegen sind in den Dendrogrammen weit voneinander entfernt. Die RFLP-Gruppe XIII befindet sich innerhalb des „Hauptclusters“, während die RFLP-Gruppe VII davon deutlichst abgetrennt ist.
- \* Auch die parallel von einer infizierten *Rh. ferrugineum*-Pflanze isolierten Stämme in RFLP-Gruppe VIII und X, für die schon in den DNA-DNA-Hybridisierungen Unterschiede nachgewiesen worden waren (Gruppe F bzw. x), gruppieren in den Dendrogrammen nicht direkt zusammen, stehen aber beide innerhalb des „Hauptclusters“. Ebenso steht die RFLP-Gruppe IX mit einem weiteren Vertreter der DNA-DNA-Homologie-Gruppe F innerhalb dieses „Hauptclusters“.
- \* Und auch die beiden RFLP-Gruppen II und III mit Vertretern der DNA-DNA-Homologie-Gruppe B stehen innerhalb des „Hauptclusters“. In der Distanzanalyse stehen sie sogar in einem Cluster, während sie in der Parsimony-Analyse getrennt sind.

Um den Einfluß der verwendeten Enzyme, die z.T. unterschiedlich differenzieren (siehe Abb.3.1.3.2.2-1), auf die Ähnlichkeitsanalyse abzuschätzen, wurde ein „Enzym-Jackknifing“ durchgeführt. Es wurden hierbei in allen sechs möglichen Kombinationen nur die Daten von je fünf der sechs Enzyme mit einer Distanzanalyse verrechnet. Auch diese gezielt reduzierten Datensätze lieferten jeweils ein eindeutiges UPGMA-Dendrogramm. Aus den sechs Dendrogrammen (siehe Anhang XII) wurde ein striktes Consensus-Dendrogramm erstellt, das die allen Datensätzen gemeinsame Information zusammenfaßt (Abb.3.1.3.4-3).



**Abb.3.1.3.4-3: Consensus-Dendrogramm des „Enzym-Jackknifing“.** Strikter Consensus aus den sechs UPGMA-Dendrogrammen der um je ein Enzym reduzierten Datensätze.

Das „Enzym-Jackknifing“ zeigt die RFLP-Gruppen I und VII wieder in einer Gruppe und genauso wie RFLP-Gruppe VI vom „Hauptcluster“ getrennt. Allerdings zeigt sich innerhalb dieses „Hauptclusters“ kaum mehr eine Auflösung. Innerhalb des „Hauptclusters“ wechseln die Beziehungen der RFLP-Gruppen je nach verrechneten Enzymen deutlich, so daß sich nur wenige Beziehungen als stabil und relativ unabhängig von den ausgewählten Enzymen erweisen. Nur drei Cluster finden sich immer: die beiden RFLP-Gruppen der 2.6 kb-Größenklasse von *V. uliginosum* (IV und XV), die vier RFLP-Gruppen der 2.6 kb-Größenklasse von *Rh. indicum* und *Rh. degronianum* (XII, XIII, XIV und XVI), sowie die beiden RFLP-Gruppen der 2.9 kb-Größenklasse von *And. polifolia* und *Thea sinensis*, die allerdings bei diesem Verfahren ihre basale Stellung im Verhältnis zu den anderen RFLP-Gruppen des „Hauptclusters“ verlieren.

Die aus den PCR-RFLP-Daten resultierende Gruppierung der untersuchten *Exobasidium*-Stämme und ihre Ähnlichkeitsanalyse erbrachte auch einige unerwartete Resultate. Zum einen wurde für einige Stämme, von denen Konspezifität und damit eine genetische Einheitlichkeit zu erwarten war ('Einsporkulturen', DNA-DNA-Homologie-Gruppen), eine Aufspaltung in zwei RFLP-Gruppen beobachtet, welche meist auch nicht nächst ähnlich in ihrem RFLP-Mustern sind. Zusätzlich fand sich bei den Isolaten von Rhododendren eine unerwartete Vielfalt an RFLP-Gruppen. Bei den europäischen Wirtsarten *Rh. ferrugineum*, *Rh. hirsutum* und *Rh. x intermedium* sind es fünf RFLP-Gruppen, die auch noch an unterschiedlichen Stellen in den Dendrogrammen zu finden sind, während es bei *Rh. indicum* drei RFLP-Gruppen sind, die allerdings immer gemeinsam gruppieren. Und entgegen den Erwartungen findet sich in den Dendrogrammen keine nähere Beziehung zu den Wirtspflanzen bzw. deren Verwandtschaftsverhältnissen. In den Dendrogrammen stellen sich nur die RFLP-Gruppen von *V. uliginosum*, von *Menz. ferruginea* und die von *Rh. indicum* als jeweils nächst ähnlich heraus, die *Rhododendron*- und *Vaccinium*-Parasiten sind durchmischt, und *Exobasidium reticulatum* von *Thea sinensis*, der einzigen nicht den Ericaceen angehörenden Wirtsart, gruppiert innerhalb der übrigen RFLP-Gruppen. Besonders auffallend schließlich sind die vergleichsweise großen Distanzen, die die RFLP-Gruppen I, VI und VII vom „Hauptcluster“ trennen. Diese Differenzierung, die auch dem „Enzym-Jackknifing“ standhält, zeigt unerwartet hohe Unterschiede im analysierten 5'-Bereich der 26S rDNA sogar innerhalb von Stämmen, die als 'Einsporkulturen' isoliert worden waren. Um diese zum Teil überraschenden Ergebnisse näher zu untersuchen und Aussagen zur Systematik und Phylogenie der untersuchten Stämme treffen zu können, wurden rDNA-Sequenzanalysen an die PCR-RFLP-Analysen angeschlossen.

## **3.2 Gruppierung ausgewählter Stämme nach Sequenzdaten der Domäne I der 26S rDNA**

### **3.2.1 Alignment und Vergleich der Sequenzen der Domäne I der 26S rDNA innerhalb der Gattung *Exobasidium***

Für einen Sequenzvergleich ausgewählter Vertreter der RFLP-Gruppen wurden Teile der 26S rDNA von 29 Stämmen ausgehend von PCR-Produkten mit dem Primerpaar LR0R/LR9 sequenziert. Partiaalsequenzen der PCR-Produkte, die nahezu die gesamte Domäne I der 26S rDNA umfassen, wurden erstellt (siehe Anhang II). Die Daten der Domäne I der 26S rDNA konnten mit 19 Referenzsequenzen anderer *Exobasidium*-Stämme aus GENBANK verglichen werden (siehe Kapitel 2.3.4.3.1). Die Referenzsequenzen umfassen zusätzlich zu *Exobasidium*-Arten, deren Wirte denselben Gattungen angehören wie die Wirte der in dieser



Arbeit untersuchten Stämme, auch drei *Exobasidium*-Arten von Wirten anderer Gattungen: *E. bisporum* von *Eubotryoides grayana* Hara, *E. pieridis-ovalifoliae* von *Lyonia neziki* Nakai & Hara und *E. symploci-japonicae* von *Symplocus* spec. Ein Vergleich mit den in GENBANK verfügbaren *Exobasidium*-Sequenzen soll einerseits helfen, die genetischen Distanzen zwischen den hier bearbeiteten Stämmen besser zu verstehen. Darüber hinaus soll aber auch geprüft werden, inwieweit es möglich ist mit Hilfe der Sequenzen von anderen *Exobasidium*-Isolaten, die nach dem NANNFELDTsche Artkonzept charakterisiert wurden, eine Zuordnung der hier untersuchten älteren Stämme zu Arten nach diesem Konzept vorzunehmen.

Die Sequenzen der Domäne I von insgesamt 46 *Exobasidium*-Stämmen wurden in einem Alignment zusammengefaßt. Anfang und Ende der einzelnen Partialsequenzen der 26S rDNA sind aufgrund ungleich langer Sequenziererergebnisse bzw. Datenbankeinträge nicht einheitlich. Daher wurden für die nachfolgenden Analysen die Randbereiche wesentlich längerer Sequenzen gekürzt und fehlende Basen (v.a. am 5'-Ende einiger kürzerer Sequenzen) mit „?“ aufgefüllt. Das resultierende Alignment (Anhang XIII) umfaßt 599 homologisierte Sequenzpositionen, die dem Bereich von Position 57 bis 612 bei *Saccharomyces cerevisiae* entsprechen (siehe auch Anhang II). Drei der mit PCR-RFLPs analysierten Stämme sind in GENBANK mit Sequenzdaten vertreten. Während *E. reticulatum* CBS 156.85 in der vorliegenden Arbeit nicht sequenziert wurde, sind die hier erhobenen Sequenzen der beiden Stämme *E. shiraianum* CBS 157.85 und *E. japonicum* CBS 153.85 mit den GENBANK-Einträgen identisch.

Ein direkter Sequenzvergleich unter Berücksichtigung aller Unterschiede, d.h. sowohl von Substitutions- als auch Insertions-Deletions-Ereignissen (sogenannte „Indels“), zeigt eine sehr hohe Sequenzhomologie zwischen einigen Stämmen. Die entsprechenden Stämme werden daher im folgenden in Gruppen zusammengefaßt, deren 26S rDNA-Partialsequenzen bei einem paarweisen Vergleich an maximal zwei Alignmentpositionen Unterschiede aufweisen. Es lassen sich so 10 Gruppen von Stämmen definieren, die in dem Alignment in Anhang XIII jeweils in einem Block zusammengefaßt sind. Vertreter einer RFLP-Gruppe haben immer sehr ähnliche oder gar identische Sequenzen und finden sich daher immer in einer solchen Gruppe. Auch lassen sich die meisten der hier sequenzierten Stämme über eine solche hohe Homologie einzelnen Referenzsequenzen zuordnen. Zwischen diesen Gruppen bzw. auch im Vergleich zu anderen, einzeln stehenden Sequenzen finden sich mindestens fünf unterschiedliche Alignmentpositionen (z.B. PB 4381 = FO 31767 im Vergleich zu PB 5634 = FO 24040-2), meist deutlich mehr. Diese Sequenzübereinstimmungen und resultierenden Zuordnungen werden über eine phylogenetische Analyse im folgenden Kapitel näher charakterisiert. Da sich aber schon bei der Erstellung des Alignments größere Unterschiede der Sequenzen von Stämmen der RFLP-Gruppen I, VI und VII gegenüber den Sequenzen von Stämmen des „Hauptclusters“ der PCR-RFLP-Analyse zeigten, sollen die Sequenzen dieser

drei RFLP-Gruppen zunächst näher betrachtet werden.

Im Gegensatz zu den Stämmen des „Hauptclusters“ der PCR-RFLP-Analyse, die untereinander und mit den Referenzsequenzen aus GENBANK problemlos zu alignieren waren, ergaben sich beim Alignment der Sequenzen dieser drei RFLP-Gruppen deutlich variable Verhältnisse (nach Alignmentposition 380) und einige zusätzliche Indel-Positionen (siehe z.B. Positionen 74 bis 83). Die Sequenzen zeigen jedoch keine großen Längenunterschiede zueinander. Die kürzesten Sequenzen innerhalb des „Hauptclusters“ bzw. der *Exobasidium*-Referenzsequenzen mit 580 bp zeigen Stamm RBF 727 und *E. myrtilli* AF487390, während die längsten Sequenzen bei *E. reticulatum* AF487397 und *E. oxycocci* AF487391 mit 585 bp die gleiche Länge wie die Sequenzen der drei Stämme der RFLP-Gruppe I haben. Nur ein bzw. zwei Basen länger sind die Sequenzen von PB 2857e bzw. PB 4898-9 (RFLP-Gruppe VII). Für Stamm RBF 726 (RFLP-Gruppe VI) kann keine vergleichbare Länge angegeben werden, da seine Sequenz am 5'-Ende kürzer ist, aber ansonsten bestehen auch hier keine wesentlichen Längendifferenzen.

Da die Vertreter der RFLP-Gruppen I, VI und VII, die bereits in den PCR-RFLP-Analysen eine große Distanz zu allen übrigen *Exobasidium*-Stämmen aufwiesen, auch beim Alignment der 26S rDNA-Partialsequenzen im Vergleich zu allen anderen sequenzierten Stämmen und den Referenzsequenzen aus GENBANK unterschiedlich erschienen, wurde mit diesen Sequenzen eine BLAST-Suche in GENBANK durchgeführt, um nächst ähnliche Sequenzen bzw. Taxa zu finden. In dem alignierten Bereich der Domäne I sind die Sequenzen der drei Vertreter der RFLP-Gruppe I untereinander identisch, während die Sequenzen von PB 2857e und PB 4898-9 Unterschiede an zwei Positionen aufweisen (ein Indel an Alignmentposition 99 und einen Basenaustausch an Position 548). Die BLAST-Suche charakterisiert 26S rDNA-Partialsequenzen der Vertreter der RFLP-Gruppen I, VI und VII als nächst ähnlich zu Sequenzen von Taxa, die außerhalb der Exobasidiales angesiedelt sind (Tab.3.2.1-1). Die RFLP-Gruppen I und VII zeigen mit ihren 26S rDNA-Partialsequenzen höchste Übereinstimmung mit Vertretern der Entylomatales und Stamm RBF 726 (RFLP-Gruppe VI) mit solchen der Ustilaginales. Mit Sequenzeinträgen von Exobasidien findet sich bei der Datenbanksuche nur eine vergleichsweise geringe, um die Hälfte bis Zweidrittel darunter liegende Ähnlichkeit. Die Stämme des „Hauptclusters“ hingegen werden in BLAST-Suchen als nächst ähnlich zu *Exobasidium*-Sequenzen charakterisiert.

---

**Tab.3.2.1-1: Datenbankvergleich in GENBANK mittels BLAST-Suche.** Ergebnis der Suche über alle DNA-Sequenzeinträge. Der „Score“-Wert gibt die Übereinstimmung zwischen Suchsequenz (Stamm/RFLP-Gr.) und Datenbankeintrag an. Zusätzlich ist für den jeweils ähnlichsten GENBANK-Eintrag der absolute Unterschied zu der Suchsequenz aufgeführt.

Stamm/ RFLP-Gr.	ähnlichster GENBANK-Eintrag	Score	im verglichenen Bereich:	ähnlichste <i>Exobasidium</i> -Sequenz	Score
RBF 726 VI	<i>Ustilago maydis</i> (DC.) Corda AF453938	821	kein Unterschied auf 420 bp	<i>E. c.f. vaccinii</i> AF487398	268
PB 2857e VII	<i>Entyloma holwayi</i> Syd. AF009854	1148	4 Unterschiede auf 595 bp	<i>E. karstenii</i> AF487389	535
PB 4898-9 VII	<i>Entyloma ficariae</i> A.A.Fisch.Waldh. AJ235295	1124	2 Unterschiede auf 579 bp	<i>E. karstenii</i> AF487389	513
PB 383 PB 393 PB 3276 I	<i>Tilletiopsis</i> <i>washingtonensis</i> Nyland AJ235278	1144	kein Unterschied auf 577 bp	<i>E. karstenii</i> AF487389 bzw. <i>E. arescens</i> AF352057	589 bzw. 573

### 3.2.2 Phylogenetische Analyse der Sequenzen der Domäne I der 26S rDNA innerhalb der Gattung *Exobasidium*

Zur Darstellung der Ähnlichkeiten der 26S rDNA-Partialsequenzen der hier untersuchten Stämme und zum Vergleich mit den Referenzsequenzen wurden phylogenetische Verfahren zur Stammbaumrekonstruktion angewandt, die möglichst alle auftretenden Unterschiede berücksichtigen. Damit alle Unterschiede des Alignments in die Berechnungen der Dendrogramme einbezogen werden, wurden zum einen Distanzanalysen durchgeführt, die auch variable, aber parsimony-uninformative Merkmale verrechnen. Zum anderen wurden bei Parsimony-Analysen Gaps auch als fünfter Merkmalszustand gewertet. Die 599 Alignmentpositionen enthalten 190 variable Merkmale, von denen 121 parsimony-informativ sind, wenn Gaps als fünfter Merkmalszustand gewertet werden. Werden Gaps als fehlende Daten kodiert, so reduziert sich die Zahl variabler Merkmale auf 173 und die der parsimony-informativen auf 115.

Als Ergebnis der Distanzanalysen wird stellvertretend ein Dendrogramm nach dem HKY85-Modell vorgestellt (Abb.3.2.2-1). Dieselbe Topologie ergibt sich auch mit weiteren Koeffizienten (u.a. Kimura-2-Parameter), während andere Koeffizienten (u.a. Jukes/Cantor, Kimura-3-Parameter) eine geringfügig unterschiedliche Topologie liefern. Hier nehmen *E. oxycocci* und die *E. myrtilli* - *E. sundstroemii*-Gruppe eine andere Stellung ein. Sie erscheinen als zwei getrennte Linien über der *E. karstenii*-Gruppe vor einem großen Cluster der übrigen *Exobasidien*. Die 10 Gruppen, deren Stämme im paarweisen Vergleich weniger als zwei unterschiedliche Alignmentpositionen aufweisen (siehe Anhang XIII), finden sich in dieser Analyse als Cluster mit hohen Bootstrap- und Jackknife-Werten von über 83% bzw. 90%. Darüber hinaus finden nur wenige Beziehungen in diesem Dendrogramm eine Bootstrap- bzw. Jackknife-Unterstützung.

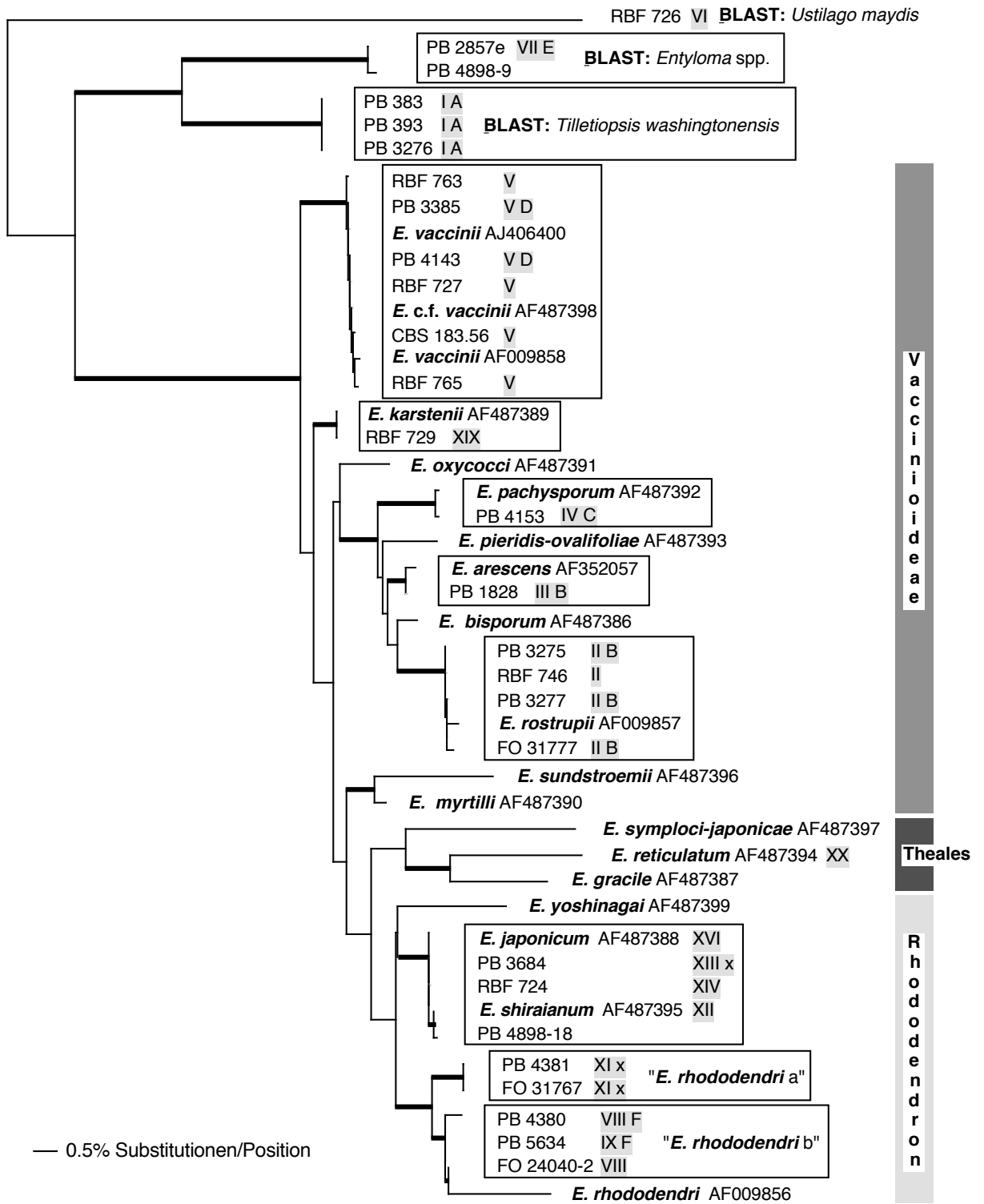


Abb.3.2.2-1

**Abb.3.2.2-1:** Dendrogramm einer Distanzanalyse der Sequenzen der Domäne I der 26S rDNA. HKY85-Modell und Neighbor-Joining mit Midpoint Rooting. Äste mit >50% Bootstrap- und >60% Jackknife-Unterstützung sind hervorgehoben. In Gruppen (Boxen) zusammengefaßt sind Stämme mit weniger als zwei unterschiedlichen Alignmentpositionen im paarweisen Vergleich. RFLP- und DNA-DNA-Homologie-Gruppenzugehörigkeit der Stämme sind angegeben.

Die Parsimony-Analyse mit Gaps als fünftem Merkmalszustand resultierte in 12 gleich sparsamsten Bäumen mit einer Gesamtlänge von 346 Schritten (CI = 0,699, RC = 0,601, RI = 0,859 und HI = 0,301) bei Berücksichtigung aller variablen Merkmale und von 272 Schritten (CI = 0,618, RC = 0,531, RI = 0,859 und HI = 0,382) bei Berücksichtigung nur der parsimony-informativen Merkmale. Eines dieser 12 gleichwertigen Dendrogramme ist in Abb.3.2.2-2 dargestellt, um die Astlängen und damit die Differenzen bzw. notwendigen Merkmalsübergänge zwischen einzelnen Sequenzen zeigen zu können. Nur bei absolut identischen Sequenzen resultieren in dieser Analyse terminale „Äste“ mit einer Länge von 0 Schritten. Jedoch weisen die 12 gleich sparsamsten Bäume z.T. recht unterschiedliche Gruppierungen auf, so daß ein striktes Consensus-Dendrogramm nur noch die wenigen allen Dendrogrammen gemeinsamen Cluster enthält (Abb.3.2.2-3). Diese relativ schlechte Auflösung der Parsimony-Analyse spiegelt sich gleichzeitig in den niedrigen Bootstrap- und Jackknife-Werten wider, die nur für wenige Äste eine statistische Absicherung liefern und i.d.R. schlechter sind als bei der Distanzanalyse. Selbst die *E. arescens* - PB 1828-Gruppe mit nur einer unterschiedlichen Basenposition zwischen den beiden Sequenzen (Alignmentposition 30) erlangt nur Bootstrap- und Jackknife-Werte von etwas über 50%, da die Sequenzen von *E. bisporum* und *E. pieridis-ovalifoliae* sich in zu wenigen parsimony-informativen Merkmalen von ihnen unterscheiden.

**Abb.3.2.2-2:** Dendrogramm der Parsimony-Analyse der Sequenzen der Domäne I der 26S rDNA mit Gaps als fünftem Merkmalszustand. Einer von 12 gleichwertigen, gleich sparsamsten Bäumen mit über alle variablen Merkmale ermittelten Astlängen. Midpoint Rooting. Äste mit >50% Bootstrap- und >60% Jackknife-Unterstützung sind hervorgehoben. In Gruppen (Boxen) zusammengefaßt sind Stämme mit weniger als zwei unterschiedlichen Alignmentpositionen im paarweisen Vergleich. RFLP- und DNA-DNA-Homologie-Gruppenzugehörigkeit der Stämme sind angegeben.

**Abb.3.2.2-3:** Consensus der Parsimony-Analyse der Sequenzen der Domäne I der 26S rDNA mit Gaps als fünftem Merkmalszustand. Aus den 12 gleich sparsamsten Bäumen erstelltes striktes Consensus-Dendrogramm. Midpoint Rooting. Äste mit >50% Bootstrap- und >60% Jackknife-Unterstützung sind hervorgehoben.

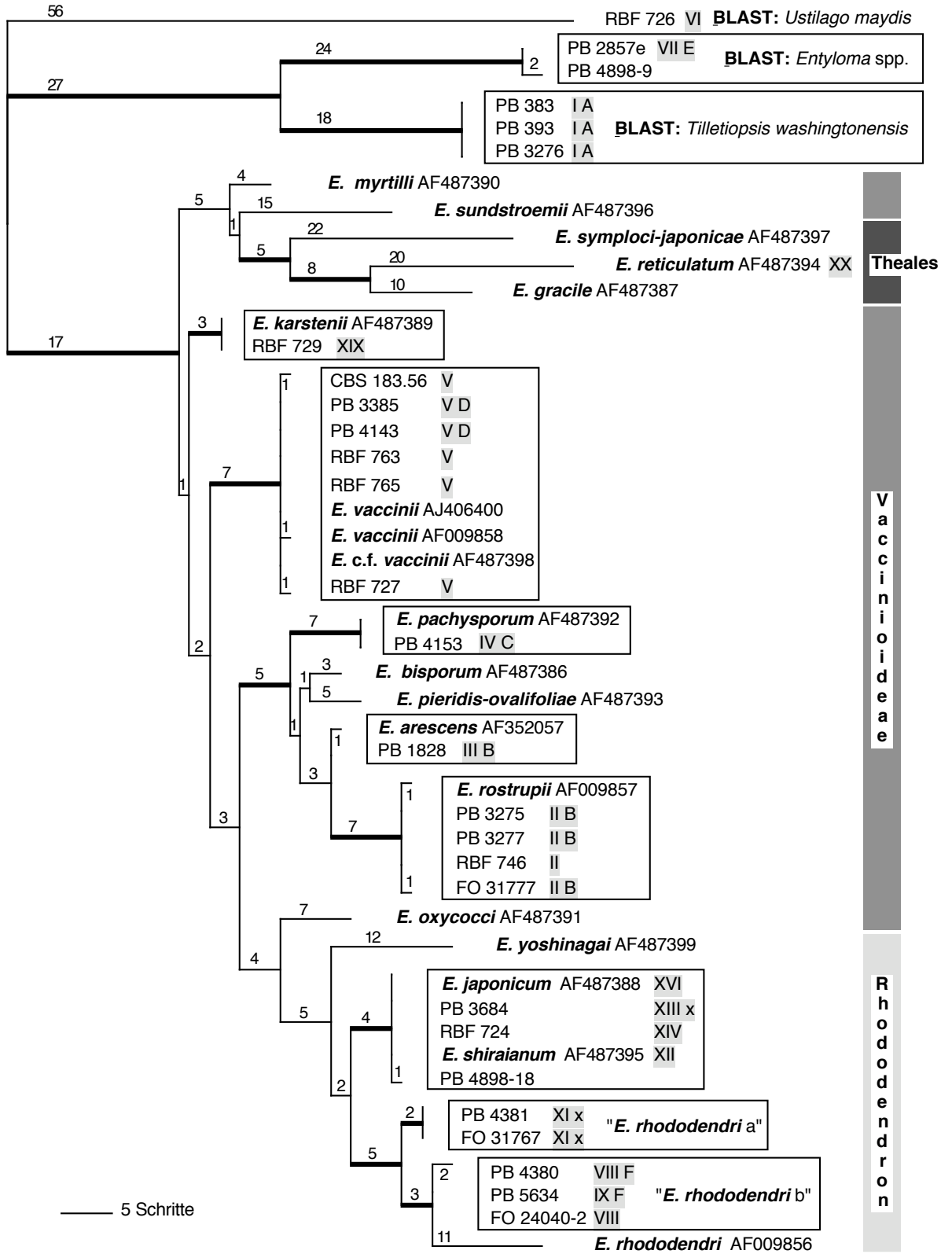


Abb.3.2.2-2

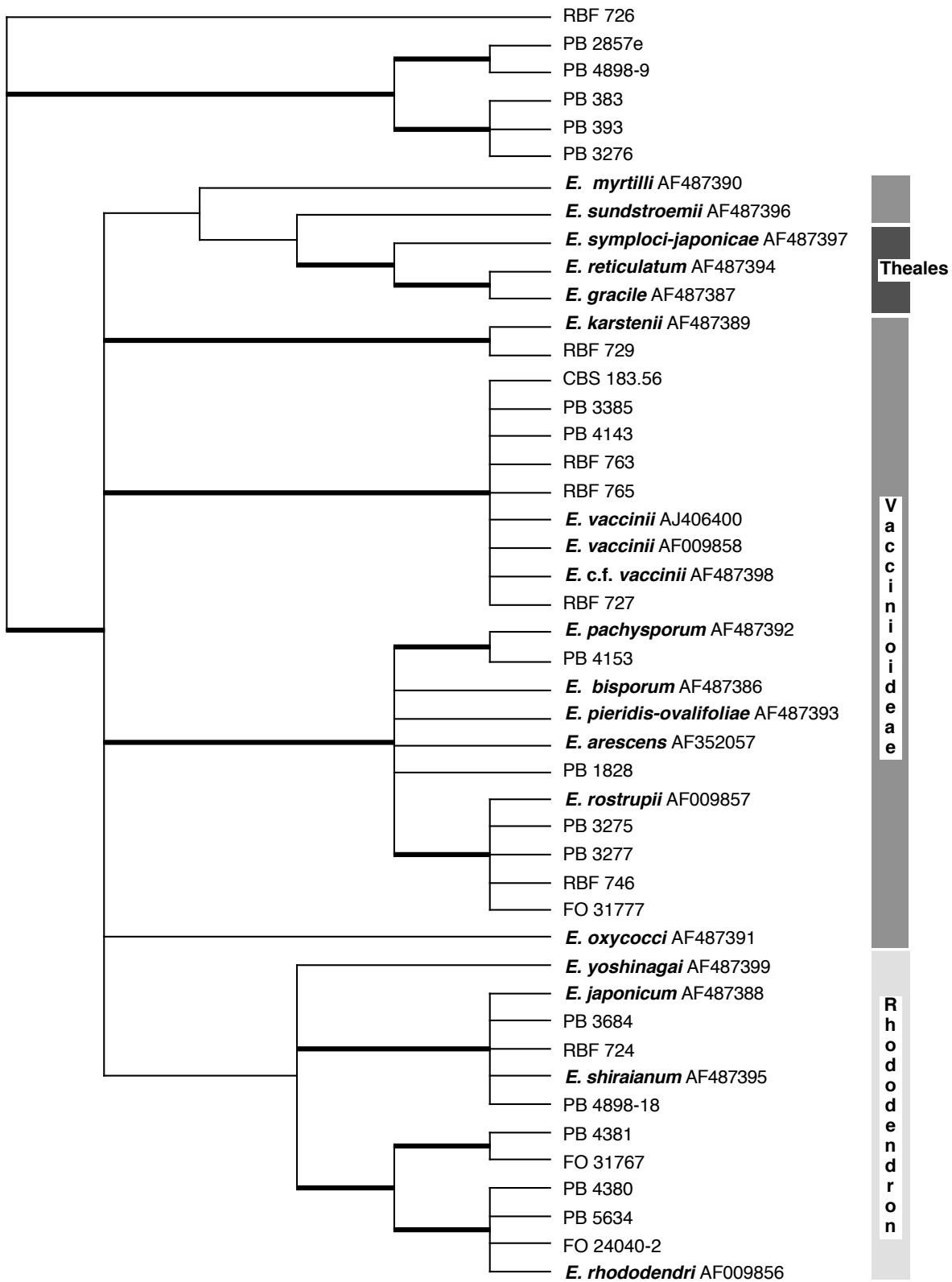


Abb.3.2.2-3

Eine vergleichende Parsimony-Analyse, in der Gaps als fehlende Daten kodiert wurden, ergab sieben gleich sparsame Bäume mit einer Gesamtlänge von 320 bzw. 258 Schritten, deren strikter Consensus bei einer etwas besseren basalen Auflösung alle Cluster des in Abb.3.2.2-3 gezeigten Consensus-Dendrogrammes bestätigt.

Die phylogenetische Analyse der 26S rDNA-Partialsequenzen resultiert in einer Aufteilung der untersuchten Stämme in eine größere Gruppe von Stämmen, die dem „Hauptcluster“ der PCR-RFLP-Analyse entspricht. Gleichzeitig bilden die RFLP-Gruppen I und VII ein deutlich abgetrenntes Cluster, und Stamm RBF 726 nimmt eine basale Stellung ein. Relativ geringe genetische Distanzen sind innerhalb des „Hauptclusters“ der Exobasidien zu beobachten, während diese drei RFLP-Gruppen - wie es schon aufgrund der Alignmentanalyse (siehe vorhergehendes Kapitel) zu erwarten war - durch deutlich größere Distanzen von dem „Hauptcluster“ abgetrennt sind. Dementsprechend erhält diese Großgliederung in den Dendrogrammen, die den Distanzverhältnissen der PCR-RFLP-Analyse entspricht, auch hohe statistische Unterstützungswerte. Die Abgrenzung der RFLP-Gruppen I, VI und VII entspricht auch dem Ergebnis der BLAST-Suche, die diese Sequenzen als nächst ähnlich zu Arten der Entylomatales (I und VII) bzw. Ustilaginales (VI) auswies. Eine umfassende phylogenetische Analyse im Kontext der Basidiomyceten ist notwendig, um die genauen Verwandtschaftsverhältnisse dieser RFLP-Gruppen abzuklären (siehe Kapitel 3.4). Hierfür wurden auf Grundlage der im folgenden genauer zu beschreibenden ersten phylogenetischen Analysen einzelne Stämme und Referenzsequenzen ausgewählt, um eine zu ungleiche Verteilung von Taxa, einen verhältnismäßig zu hohen Anteil mancher Arten und damit einen negativen Einfluß auf eine größere phylogenetische Analyse zu vermeiden (zur Problematik der Taxa-Auswahl siehe HILLIS 1998).

Alle *Exobasidium*-Referenzsequenzen aus GENBANK finden sich innerhalb des „Hauptclusters“. Fast alle der hier sequenzierten Stämme zeigen hohe Affinitäten zu diesen Referenzsequenzen (d.h. es treten maximal zwei unterschiedliche Alignmentpositionen im paarweisen Vergleich auf) und clustern mit ihnen zusammen. Ausnahmen hiervon bilden nur die zwei Gruppen „*E. rhododendri* a“ und „*E. rhododendri* b“, die keine so hohe Übereinstimmung mit irgendeiner der Referenzsequenzen zeigen, aber in einem größeren Cluster mit *E. rhododendri* AF009856 gruppieren. Die Gruppen hoher Sequenzübereinstimmung von hier analysierten Stämmen mit Referenzsequenzen finden i.d.R. eine sehr hohe statistische Unterstützung. Die Referenzsequenzen der beiden von asiatischen Rhododendren stammenden Arten *E. japonicum* und *E. shiraiianum* sind identisch und von der des in Kanada isolierten Stammes PB 4898-18 nur in einer Basenposition verschieden. Zwischen Vertretern aus unterschiedlichen Gruppen mit solch hoher Sequenzhomologie sowie auch zu weiteren, einzeln stehenden Referenzsequenzen finden sich mindestens fünf bis sieben unterschiedliche Alignmentpositionen.



Die Vertreter des „Hauptclusters“ der 26S rDNA-Analysen, die von den Stämmen der RFLP-Gruppen I, VI und VII deutlich verschieden sind, werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit als Exobasidien im engeren Sinn, *Exobasidium* s.str., angesprochen. Innerhalb dieser *Exobasidium* s.str.-Gruppe findet sich bei der phylogenetischen Analyse der Domäne I der 26S rDNA eine deutliche Aufgliederung gemäß den Wirten. Vor allem in der Distanzanalyse kommt eine klare Korrelation mit der systematischen Stellung der Wirtspflanzen zum Ausdruck. Alle Exobasidien von Wirten der Vaccinioideae finden sich als basale Linien, diejenigen von Wirten der Theales bilden daran anschließend eine Schwestergruppe zu denen von *Rhododendron*-Arten. In der Parsimony-Analyse hingegen bilden die Exobasidien von Wirten der Theales eine abgeleitete Gruppe innerhalb der Exobasidien von Wirten der Vaccinioideae. Allerdings findet sich nur für wenige Beziehungen innerhalb dieser Gruppe eine statistische Absicherung. Die Beziehungen innerhalb *Exobasidium* s.str. werden in der Parsimony-Analyse (siehe Abb.3.2.2-3) kaum aufgelöst und können daher die Topologie aus den Distanzanalysen weder unterstützen noch ihr widersprechen. Als einzige Abweichung ist festzuhalten, daß *E. sundstroemii* und *E. myrtilli* in der Parsimony-Analyse basal zu den Exobasidien von Wirten aus der Ordnung Theales stehen (*E. symploci-japonicae*, *E. reticulatum*, *E. gracile*), während sie in der Distanzanalyse die Schwestergruppe zu einem größeren Cluster aus diesen drei Arten und allen *Rhododendron*-Parasiten bilden.

Vergleicht man die Gruppierungen aufgrund der Sequenzen der Domäne I der 26S rDNA mit der Zuordnung der Stämme zu den PCR-Produktgrößenklassen des Primerpaares LR0R/LR9 und deren Bedeutung bei den PCR-RFLP-Analysen (vergleiche Abb. 3.1.3.4-1 und -2), so zeigen sich Unterschiede:

- \* Innerhalb *Exobasidium* s.str. haben Stämme von *Rhododendron*-Wirtsarten sowohl 2.2 kb als auch 2.6 kb große PCR-Produkte. Die in den PCR-RFLP-Analysen entsprechend getrennten Gruppen finden sich nach der Sequenzanalyse nicht nur in einem gemeinsamen Cluster aller *Rhododendron*-Parasiten, sondern mit der „*E. rhododendri* b“-Gruppe gibt es sogar ein Cluster von Stämmen hoher Sequenzhomologie trotz unterschiedlicher PCR-Produktgrößen.
- \* Die in den PCR-RFLP-Analysen gefundene enge Beziehung der Stämme von *Andromeda* und *Thea* aus der 2.9 kb-Größenklasse (RFLP-Gruppen XIX und XX) findet sich in der Sequenzanalyse nicht. Stamm RBF 729 von *And. polifolia* befindet sich in der *E. karstenii*-Gruppe und ist von der Gruppe der Theales-Parasiten getrennt.

Weitere Vergleiche der phylogenetischen Analyse der 26S rDNA-Partialsequenzen mit den PCR-RFLP-Analysen, der DNA-DNA-Homologie-Gruppenzugehörigkeit sowie der Herkunft der Stämme zeigen folgende Ergebnisse:

- \* Die Trennung der 'Einsporkulturen' von PB 4898 in den RFLP-Gruppen VII (2.2 kb) und XIII (2.6 kb) bestätigt sich. Eine Affinität der Sequenz von Stamm PB 4898-9 zu Taxa außerhalb der Exobasidiales (*Entyloma*-Arten) zeigte sich in der BLAST-Suche. Dieser Stamm findet sich dementsprechend in der Sequenzanalyse außerhalb des „Hauptclusters“, während Stamm PB 4898-18 in das Cluster der *Rhododendron*-Parasiten innerhalb von *Exobasidium* s.str. eingegliedert ist.
- \* Die Teilung der DNA-DNA-Homologie-Gruppe B wird im Sequenzvergleich bestätigt. Die Vertreter der RFLP-Gruppen II und III (2.8 bzw. 2.6 kb) finden sich in getrennten Clustern mit hohen Sequenzhomologien zu den Referenzsequenzen von *E. rostrupii* einerseits bzw. *E. arescens* andererseits.
- \* Die Teilung der DNA-DNA-Homologie-Gruppe F in die beiden RFLP-Gruppen VIII (2.6 kb) und IX (2.2 kb) findet keine Unterstützung in dem Sequenzvergleich. Vertreter dieser beiden RFLP-Gruppen gruppieren trotz der unterschiedlichen Größen des LR0R/LR9-PCR-Produktes bei den Partialsequenzen der Domäne I mit hoher Sequenzaffinität gemeinsam, wobei der Stamm PB 4380 in zwei Basenpositionen (Alignmentpositionen 395 und 571) von PB 5634 und FO 24040-2 verschieden ist. Die Ursache für die Auftrennung der DNA-DNA-Homologie-Gruppe F in den PCR-RFLP-Analysen liegt somit in der Größendifferenz der mit PCR-RFLPs analysierten Fragmente.
- \* Für die zwei PCR-Produktgrößenklassen angehörenden und in mehrere RFLP-Gruppen aufgeteilten Vertreter der DNA-DNA-Homologie-Gruppe x bestätigt sich die PCR-Produktgröße nicht als alleinige Ursache für die Aufteilung. Auch in der Sequenzanalyse bilden die beiden Stämme der RFLP-Gruppe XI (2.2 kb) von *Rh. ferrugineum* und *Rh. hirsutum* eine Gruppe („*E. rhododendri* a“), während der Stamm PB 3684 von *Rh. indicum* (XIII, 2.6 kb) gemeinsam mit den Referenzsequenzen von *E. japonicum* und *E. shiraianum* clustert. Die Aufteilung entspricht hier den Wirtsarten.

Bei den *Rhododendron*-Parasiten zeigen die Vertreter der RFLP-Gruppen XII, XIII, XIV und XVI, die sich schon in den PCR-RFLPs kaum unterschieden, nahezu identische Sequenzen und finden sich in einem einzigen Cluster. Diese Stämme stammen von den asiatischen *Rhododendron*-Arten *Rh. indicum* und *Rh. degronianum* bzw. einem kanadischen *Rhododendron*. Dieser Stamm PB 4898-18 zeigt in der Domäne I eine einzige unterschiedliche Basenposition (Alignmentposition 15) im Vergleich mit den Exobasidien von asiatischen Wirtsarten. Die in dieser *E. japonicum* - *E. shiraianum*-Gruppe vereinigten Exobasidien werden traditionell als getrennte Arten angesprochen (LAUBERT 1932), die aber offensichtlich mit Sequenzen der Domäne I nicht differenziert werden können. *E. yoshinagai*, das auf einer weiteren asiatischen Art *Rh. reticulatum* D.Don ex G.Don vorkommt, bildet jedoch eine abgesetzte Linie. Ebenfalls getrennt davon finden sich in drei Linien die Exobasidien von europäischen *Rhododendron*-Arten, die normalerweise nur einer einzigen Art

*E. rhododendri* zugeordnet werden (NANNFELDT 1981): die Cluster „*E. rhododendri* a“ und „*E. rhododendri* b“ sowie die separat stehende Referenzsequenz von *E. rhododendri* AF009856. Dies bestätigt die in den PCR-RFLPs gefundene Vielfalt der Exobasidien von europäischen Rhododendren.

Bei den *Vaccinium*-Parasiten findet sich in der *E. rostrupii*-Gruppe neben Exobasidien von *V. oxycoccos*, deren Sequenzen im paarweisen Vergleich maximal eine unterschiedliche Basenposition aufweisen (Alignmentposition 581 bzw. 595), noch Stamm PB 3277 von *V. macrocarpum*. Die Sequenz von PB 3277 ist mit der von zwei Stämmen von *V. oxycoccos* identisch. Ansonsten sind die Stämme von Vaccinien nach ihren Wirtsarten aufgetrennt. Die Gruppierung der Stämme von *Vaccinium* spp. entspricht damit völlig dem NANNFELDTschen Konzept einer hohen Wirtsspezifität (siehe Tab.1.2-1). Auch lösen die Stämme der *E. arescens*-, der *E. pachysporum*- und der *E. rostrupii*-Gruppe jeweils ein spezifisches Befallsbild auf ihren Wirtspflanzen aus. Nur die *E. vaccinii*-Gruppe stellt hier eine Ausnahme dar, denn Stämme, die eine lokale Gallbildung induzieren (RBF 763, RBF 765), sind mit Hilfe der 26S rDNA nicht von solchen zu differenzieren, die ein systemisches Befallsbild hervorrufen (PB 3385, PB 4143 und RBF 727).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Auswertung der 26S rDNA-Partialsequenzen der Domäne I von ausgewählten Vertretern aus 16 RFLP-Gruppen in den meisten Fällen die Gruppierungen einzelner Stämme bestätigt, wie sie sich in der PCR-RFLP-Analyse fand. Einige überraschende Ergebnisse, wie die Aufteilung der DNA-DNA-Homologie-Gruppe B und die Differenzierung von 'Einsporkulturen' wie PB 4898, bleiben bestehen. Einige andere unerwartete Ergebnisse, wie die Differenzierung der Exobasidien von *Rh. indicum* oder auch die Aufteilung der DNA-DNA-Homologie-Gruppe F, werden hingegen relativiert. Die Beziehungen innerhalb *Exobasidium* s.str. werden durch die Ähnlichkeitsanalysen der PCR-RFLP-Daten auf der einen und die der Sequenzdaten auf der anderen Seite nicht gleich wiedergegeben. Die Domäne I der 26S DNA zeigt keine größeren Längenunterschiede in den Sequenzen der analysierten Stämme. Die Ursache für die Größenunterschiede der PCR-Produkte mit dem Primerpaar LR0R/LR9 mußte also in anderen Abschnitten dieser PCR-Produkte zu finden sein. Es wurde daher von einigen Stämmen exemplarisch ein Großteil des PCR-Produktes sequenziert, um so die Ursache der Größenunterschiede zu analysieren, die für Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen der PCR-RFLP-Analyse und der Sequenzanalyse und eventuell auch für die unterschiedliche Darstellung der phylogenetischen Beziehungen verantwortlich zu sein scheint.

### **3.3 Introns in der 26S rDNA als Ursache der unterschiedlichen PCR-Produktgrößen**

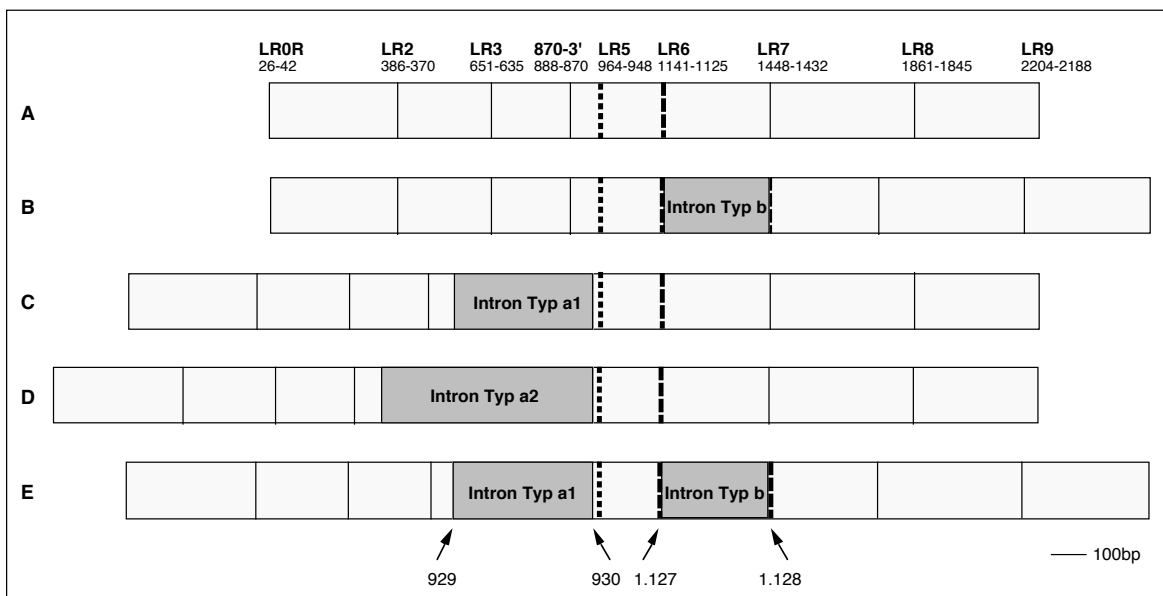
Als Ursache der Überlängen der PCR-Produkte mit dem Primerpaar LR0R/LR9 gegenüber der von *Saccharomyces cerevisiae* erwarteten Produktgröße von 2.2 kb und als Ursache der Unterschiede in den PCR-Produktgrößen konnten durch weitere Sequenzanalysen der PCR-Produkte ausgewählter Stämme spezifische Insertionen nachgewiesen werden. Die genaue Lage und ungefähre Länge der Insertionen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch Teilsequenzen dieser PCR-Produkte, v.a. mit den Primern LR5, LR6 und LR7, festgestellt. Weitere detaillierte Untersuchungen der Insertionsorte mit Sekundärstrukturanalysen der Insertionen und Sequenzvergleiche wurden in der Diplomarbeit von E. STEVANECZ (1998, Betreuer: Prof. Dr. P. BLANZ) angeschlossen. Durch die Charakterisierung der Sequenzen der Insertionsorte und die in den rRNA-Faltungen nachweisbaren für Group-I-Introns typischen Core-Elemente P, Q, R, S und helikalen P-Strukturen (BURKE *et al.* 1987, CECH 1988) konnten die Insertionen als solche bestätigt werden.

Introns in dem amplifizierten 5'-Bereich der 26S rDNA wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit an zwei Positionen in der Domäne II nachgewiesen: „vor der Primerbindungsstelle LR5“ zwischen Nukleotid 929 und 930 (bezogen auf die 26S rDNA von *Saccharomyces cerevisiae*, siehe Anhang I) und „in der LR6-Primerbindungsstelle“ zwischen Nukleotid 1.127 und 1.128. Die Insertionen an Position 929/930 zeigen keine Sequenzhomologie mit denjenigen an Position 1.127/1.128. Sie werden daher als Intron-Typ a und Intron-Typ b voneinander abgegrenzt. Für Introns an der vorderen Insertionsposition 929/930 können zwei unterschiedliche Längen festgestellt werden. Sie sind entweder etwa 400 bp (Intron-Typ a1) oder 600 bp (Intron-Typ a2) lang. Intron-Typ a2 weist im Vergleich zu Intron-Typ a1 eine zusätzliche Insertion innerhalb des Introns auf. Ansonsten lassen sich die Sequenzen der Introns vom Typ a gut miteinander alignieren. Introns an der hinteren Intronposition 1.127/1.128 (Intron-Typ b) haben eine Länge von ca. 300 bp. In dem Amplifikat der 26S rDNA desselben Stammes kann entweder kein Intron vorhandensein, ein Intron auftreten, oder aber es finden sich Introns an beiden Positionen. Hinsichtlich der Verteilung von Introns wurden so fünf unterschiedliche Typen der 26S rDNA bei *Exobasidium*-Stämmen gefunden (Abb.3.3-1). Die vier PCR-Produktgrößenklassen mit Überlängen lassen sich auf drei unterschiedliche Intron-Typen (2.5, 2.6 und 2.8 kb-Größenklasse) und eine Kombination (2.9 kb-Größenklasse) zurückführen.

In Tab.3.3-1 ist die Intron-Verteilung bei Stämmen des „Hauptclusters“ der RFLP-Analysen dargestellt. Die 26S rDNA ist bei den RFLP-Gruppen I, VI und VII intron-frei; die intron-haltigen rDNA-Typen treten alle bei oben zu *Exobasidium* s.str. gestellten Stämmen auf. In einer PCR-Produktgrößenklasse wird nur je ein Typus der 26S rDNA angetroffen.

**Tab.3.3-1** Verteilung von Introns in der 26S rDNA. Ausgewählte Stämme als Beispiele für das Vorkommen der verschiedenen Intron-Typen.

PCR-Größe	Intron 929/930	Intron 1.127/1.128	Stamm	RFLP-Gruppe
2.2 kb	-	-	alle intron-freien Stämme	
2.5 kb	-	Typ b	CBS 183.56	V
2.5 kb	-	Typ b	PB 3385	V
2.6 kb	Typ a1	-	CBS 157.85	XII
2.6 kb	Typ a1	-	PB 1828	III
2.6 kb	Typ a1	-	PB 3684	XIII
2.6 kb	Typ a1	-	PB 4153	IV
2.6 kb	Typ a1	-	PB 4380	VIII
2.8 kb	Typ a2	-	PB 3275	II
2.8 kb	Typ a2	-	RBF 746	II
2.9 kb	Typ a1	Typ b	RBF 729	XIX



**Abb.3.3-1** 26S rDNA-Typen in der Gattung *Exobasidium*: Lage und Verteilung von Group-I-Introns. **A.** Der 5'-Bereich der 26S rDNA zwischen LR0R und LR9 bei intron-freien Amplifikaten mit eingetragenen Primerbindungsstellen (LR5 und LR6 hervorgehoben). **B.** Der homologe Bereich der 2.5 kb-Größenklasse. **C.** Der homologe Bereich der 2.6 kb-Größenklasse. **D.** Der homologe Bereich der 2.8 kb-Größenklasse. **E.** Der homologe Bereich der 2.9 kb-Größenklasse. Die Nukleotidpositionen der Insertionsorte (Pfeile) sind im Vergleich zur 26S rDNA von *Saccharomyces cerevisiae* angegeben.

Auch wenn nicht für alle insertionshaltigen RFLP-Gruppen der 2.6 und 2.9 kb-Größenklasse die Introns detailliert charakterisiert wurden, so zeigt sich doch ein deutliches Muster. Die Introns vom Typ b treten ebenso wie Introns vom Typ a2 nur bei Stämmen auf, die im kodierenden Exonbereich der Domäne I jeweils hohe Sequenzhomologien aufweisen (*E. vaccinii*- bzw. *E. rostrupii*-Gruppe). Im Gegensatz dazu finden sich Introns vom Typ a1 auch bei *Exobasidium*-Stämmen, die nach der phylogenetischen Analyse der Domäne I nicht nächst verwandt sind („*E. rhododendri* b“- , *E. japonicum* - *E. shiraianum*-, *E. arescens*-, *E. pachysporum*-Gruppe). Hier zeigen die Introns beim Vergleich verschiedener Stämme auch Sequenzunterschiede und haben z.T. auch um wenige Basenpaare differierende Längen.

Introns in den 26S rDNA-Amplifikaten sind für einige der unerwarteten Ergebnisse der PCR-RFLP-Analyse verantwortlich. So war Stamm PB 4380 in der PCR-RFLP-Analyse von Stamm PB 5634 deutlich verschieden (RFLP-Gruppe VIII bzw. IX). Beide gehören einer einzigen DNA-DNA-Homologie-Gruppe an (F) und auch ihre Sequenzen der Domäne I der 26S rDNA zeigen nur zwei Basen Unterschied. Stamm PB 4380 weist aber im Gegensatz zu PB 5634 ein Intron vom Typ a1 auf.

### **3.4 Phylogenie der *Exobasidium*-Stämme im Kontext der Ustilaginomycetes aufgrund der Sequenzen der Domäne I der 26S rDNA**

Für eine umfassendere phylogenetische Analyse mit allen Ordnungen der Exobasidiomycetidae im Vergleich zu weiteren Referenzsequenzen aus den beiden anderen Unterklassen der Ustilaginomycetes wurde ein Alignment erstellt, das 64 Taxa und 525 Nukleotidpositionen umfaßt (Anhang XIV). Nach den Ergebnissen der vorhergehenden Analyse der *Exobasidium*-Sequenzen (siehe Abb.3.2.2-1 und -2) wurde aus der *Exobasidium* s.str.-Gruppe von jeder Art bzw. Gruppe mit hoher Sequenzhomologie ein Vertreter in diese Analyse übernommen; nur aus der *E. japonicum* - *E. shiraianum*-Gruppe wurde für jede der beiden Arten ein Repräsentant beibehalten. Es wurden aus den Gruppen hoher Homologie die Sequenzen folgender Stämme übernommen: *E. arescens*-Gruppe PB 1828, *E. japonicum* PB 3684, *E. karstenii*-Gruppe RBF 729, *E. pachysporum*-Gruppe PB 4153, „*E. rhododendri* a“-Gruppe PB 4381, „*E. rhododendri* b“-Gruppe PB 5634, *E. rostrupii*-Gruppe PB 3275, *E. vaccinii*-Gruppe PB 4143. Zusätzlich wurde je ein Vertreter der außerhalb von *Exobasidium* s.str. stehenden RFLP-Gruppen I, VI und VII in diese Analyse aufgenommen (PB 393, PB 2857e, RBF 726). Mit diesen Sequenzen wurden 42 weitere Sequenzen aus GENBANK aligniert (siehe Kapitel 2.3.4.3.2). Diese repräsentieren die übrigen sechs Ordnungen der Exobasidiomycetidae mit bis zu je sieben Taxa, enthalten vier Vertreter der Ustilaginomycetidae und zwei Arten der Entorrhizomycetidae als Außengruppe, da diese Unterklasse

nach BEGEROW *et al.* (1997) die basale Linie innerhalb der Klasse Ustilaginomycetes bzw. die Schwestergruppe zu den beiden anderen Unterklassen bildet. Es sind sieben weitere Gattungen der Exobasidiales enthalten, so daß alle vier Familien der Ordnung vertreten sind.

Die zusätzlichen Sequenzen wurden zu dem *Exobasidium*-Alignment geladen und ein erweitertes Alignment der Domäne I erstellt. Da Beginn und Ende der Sequenzen bei den GENBANK-Einträgen häufig kürzer waren als in dem ursprünglichen Alignment, mußte hier entsprechend gekürzt werden. Das Alignment für diese phylogenetische Analyse (Anhang XIV) entspricht den Positionen 41 bis 559 des Alignments der *Exobasidium*-Sequenzen (Anhang XIII). In diesem Alignment über Sequenzen aus dem gesamten Spektrum der Ustilaginomycetes finden sich variable Bereiche, in denen einzelne Basenpositionen nicht eindeutig zu homologisieren sind. Uneindeutige Bereiche, die insgesamt 63 Alignmentpositionen (in Anhang XIV gekennzeichnet) betreffen, wurden in einem konservativen Ansatz von der weiteren Analyse ausgeschlossen (für eine Diskussion dieser Problematik siehe u.a. GATESY *et al.* 1993, WHEELER 1999). Die in den phylogenetischen Analysen verrechnete Matrix umfaßt somit 462 Nukleotidpositionen, von denen 182 parsimony-informativ und 39 variabel, aber parsimony-uninformativ sind (Gaps als fehlende Daten gewertet). Die phylogenetische Analyse wurde nach Maximum Parsimony, mit Distanzmatrixverfahren und mit Bayes'scher Statistik vorgenommen.

Das Maximum Parsimony-Verfahren liefert 376 gleich sparsamste Bäume mit einer Gesamtlänge von 905 Schritten (CI = 0,376, RC = 0,267, RI = 0,711 und HI = 0,624) bei Berücksichtigung aller variablen Merkmale und von 861 Schritten (CI = 0,344, RC = 0,244, RI = 0,711 und HI = 0,656) bei Berücksichtigung nur der parsimony-informativen Merkmale. Diese liefern einen strikten Consensus, der zwar Gruppen widerspiegelt, aber Beziehungen von Gruppen zueinander kaum auflöst. Das Majority-Consensus-Dendrogramm (Abb.3.4-1) zeigt hingegen eine wesentlich bessere Auflösung. Hier sind aber auch Gruppen enthalten, die nicht in allen gleich sparsamsten Bäumen auftreten. Diese Topologie wurde daher über „Successive Weighting“ geprüft. Ausgehend von allen 376 Bäumen wurde durch Gewichtung der einzelnen Merkmale nach ihren individuellen Consistency-Indices nach nur drei Durchgängen mit einem strikten Consensus aus nur drei gleich sparsamsten Bäumen eine Topologie erzielt, die derjenigen des Majority-Consensus weitgehend entspricht und damit eine Unterstützung für alle Großgruppierungen liefert. Nur die Positionen von *Tilletiopsis flava* und *T. fulvescens* (ein Gruppe mit 70% Häufigkeit im Majority-Consensus) werden innerhalb der Geogefischeriales anderes wiedergegeben, und die Gruppierung von *E. sundstroemii* mit *E. myrtilli* (74% Häufigkeit im Majority-Consensus) findet keine Unterstützung mit diesem Verfahren.

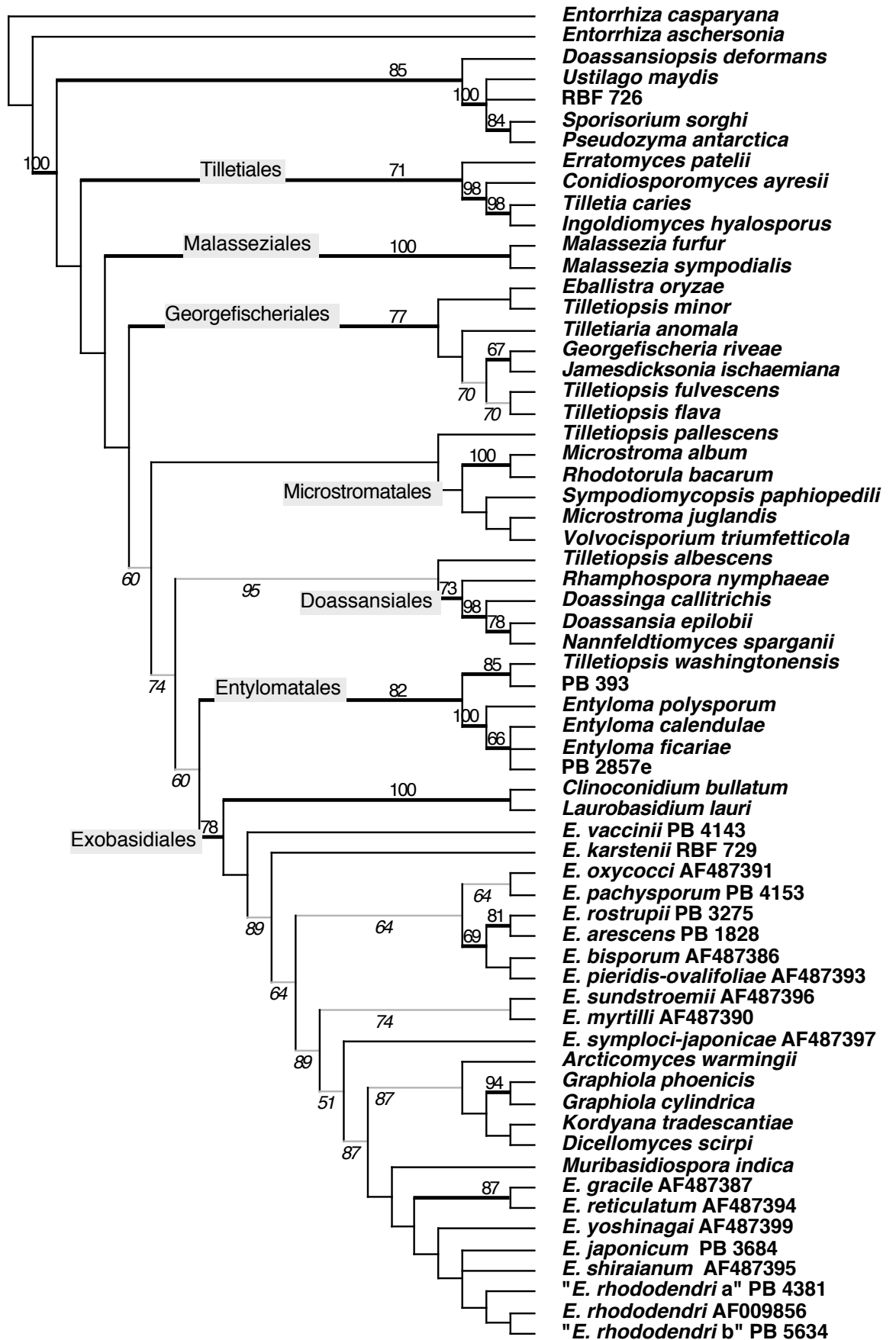


Abb.3.4-1



---

**Abb.3.4-1**      **Consensus-Dendrogramm der Parsimony-Analyse der Sequenzdaten der Domäne I der 26S rDNA bei Ustilaginomyceten.** Das zugrundeliegende Alignment ist im Vergleich zu Abb.3.2.2-1 bis -3 in der Länge gekürzt. Majority-Consensus aus 376 gleich sparsamsten Bäumen. Gewurzelt mit *Entorrhiza* spp. als Außengruppe. Die Häufigkeiten der Gruppen sind, sofern unter 100%, unter den entsprechenden, heller gezeichneten Ästen in *kursiv* angegeben. Äste mit Jackknife-Werten über 60% sind hervorgehoben und die Werte sind darüber angegeben.

---

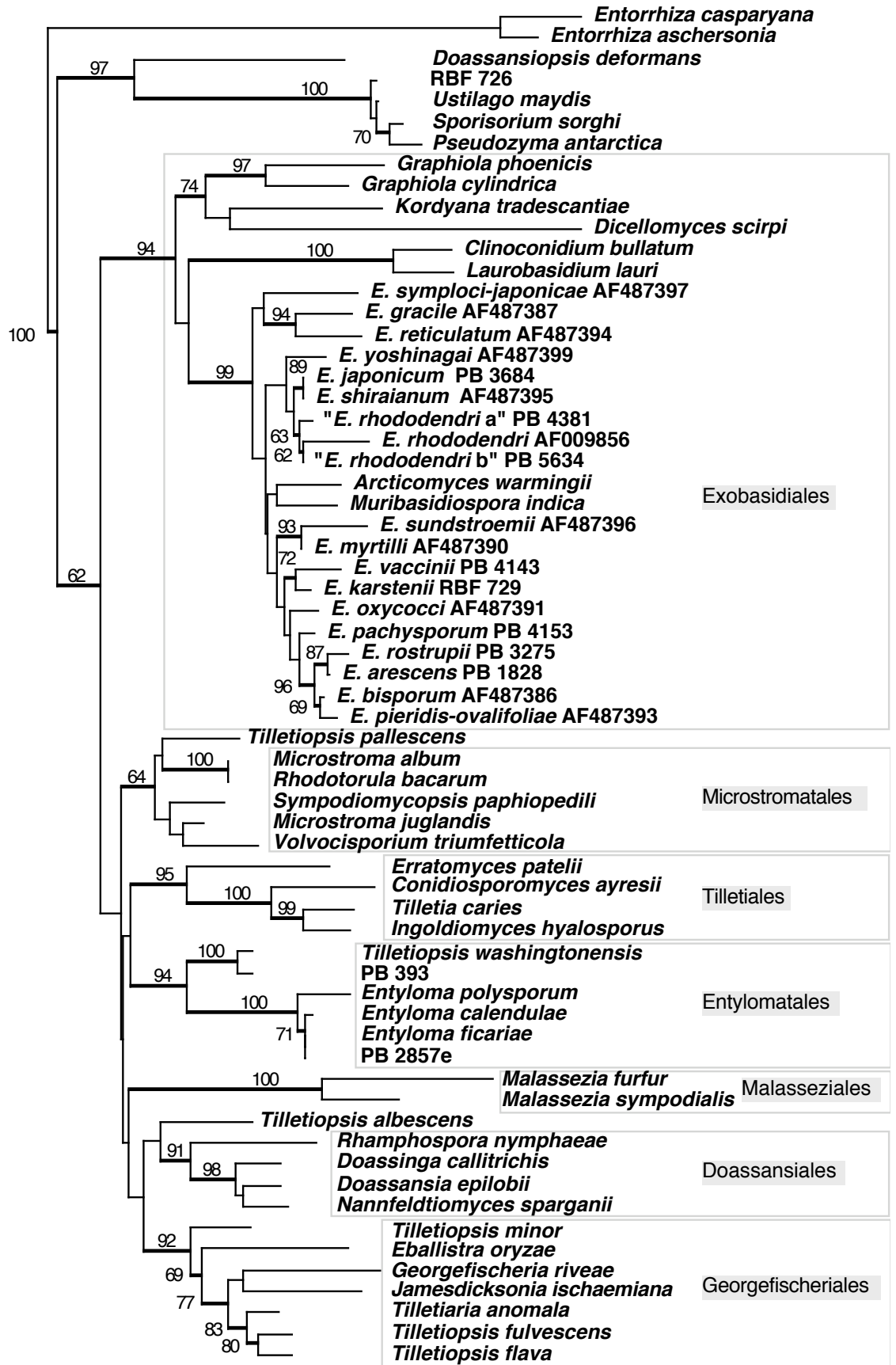
An allen Dendrogrammen sind nur Jackknife-Werte von über 60% angetragen. Die Bootstrap-Werte liegen i.d.R. unter den Jackknife-Werten, jedoch für diese Gruppen immer über 50%. In allen Analysen wurden die Stammbäume über die beiden Arten der Gattung *Entorrhiza* C.A.Weber gewurzelt.

Die Distanzanalyse ergibt je nach gewähltem Koeffizienten unterschiedliche Dendrogramme. Je ein Beispiel für die beiden grundsätzlichen Topologien ist in Abb.3.4-2 (Maximum Likelihood-Modell) und Abb.3.4-3 (Jukes/Cantor-Modell) gezeigt. Die Beziehungen der Ordnungen der Exobasidiomycetidae zueinander werden darin unterschiedlich dargestellt, wie auch die genaue Aufgliederung innerhalb der Exobasidiales. Mit weiteren Koeffizienten (z.B. HKY85, Kimura-2-Parameter) ergab sich eine Topologie, die innerhalb der Exobasidiales derjenigen nach dem Maximum Likelihood-Modell entspricht und für die Beziehungen der Ordnungen zueinander derjenigen des Jukes/Cantor-Modells. Für die unterschiedlichen Großgliederungen gibt es in den Distanzanalysen, genauso wie in den Parsimony- und Bayes'schen Analysen, bei keinem der Koeffizienten eine statistische Unterstützung.

---

**Abb.3.4-2**      **Dendrogramm der Distanzanalyse der Sequenzdaten der Domäne I der 26S rDNA nach dem Maximum Likelihood-Modell bei Ustilaginomyceten.** Das zugrundeliegende Alignment ist im Vergleich zu Abb. 3.2.2-1 bis -3 in der Länge gekürzt. Die Maximum Likelihood-Einstellungen entsprechend dem GTR-Modell mit sechs Substitutionstypen, via Maximum Likelihood ermittelten Substitutionsraten und empirisch ermittelten Basenhäufigkeiten (A = 28,172%, C = 17,50%, G = 30,237%, T = 24,091%). Neighbor-Joining. Gewurzelt mit *Entorrhiza* spp. als Außengruppe. Äste mit Jackknife-Werten über 60% sind hervorgehoben und die Werte sind angegeben.

**Abb.3.4-3**      **Dendrogramm der Distanzanalyse der Sequenzdaten der Domäne I der 26S rDNA nach dem Jukes/Cantor-Modell bei Ustilaginomyceten.** Das zugrundeliegende Alignment ist im Vergleich zu Abb.3.2.2-1 bis -3 in der Länge gekürzt. Neighbor-Joining. Gewurzelt mit *Entorrhiza* spp. als Außengruppe. Äste mit Jackknife-Werten über 60% sind hervorgehoben und die Werte sind angegeben.



— 0.01 Substitutionen/Position

Abb.3.4-2

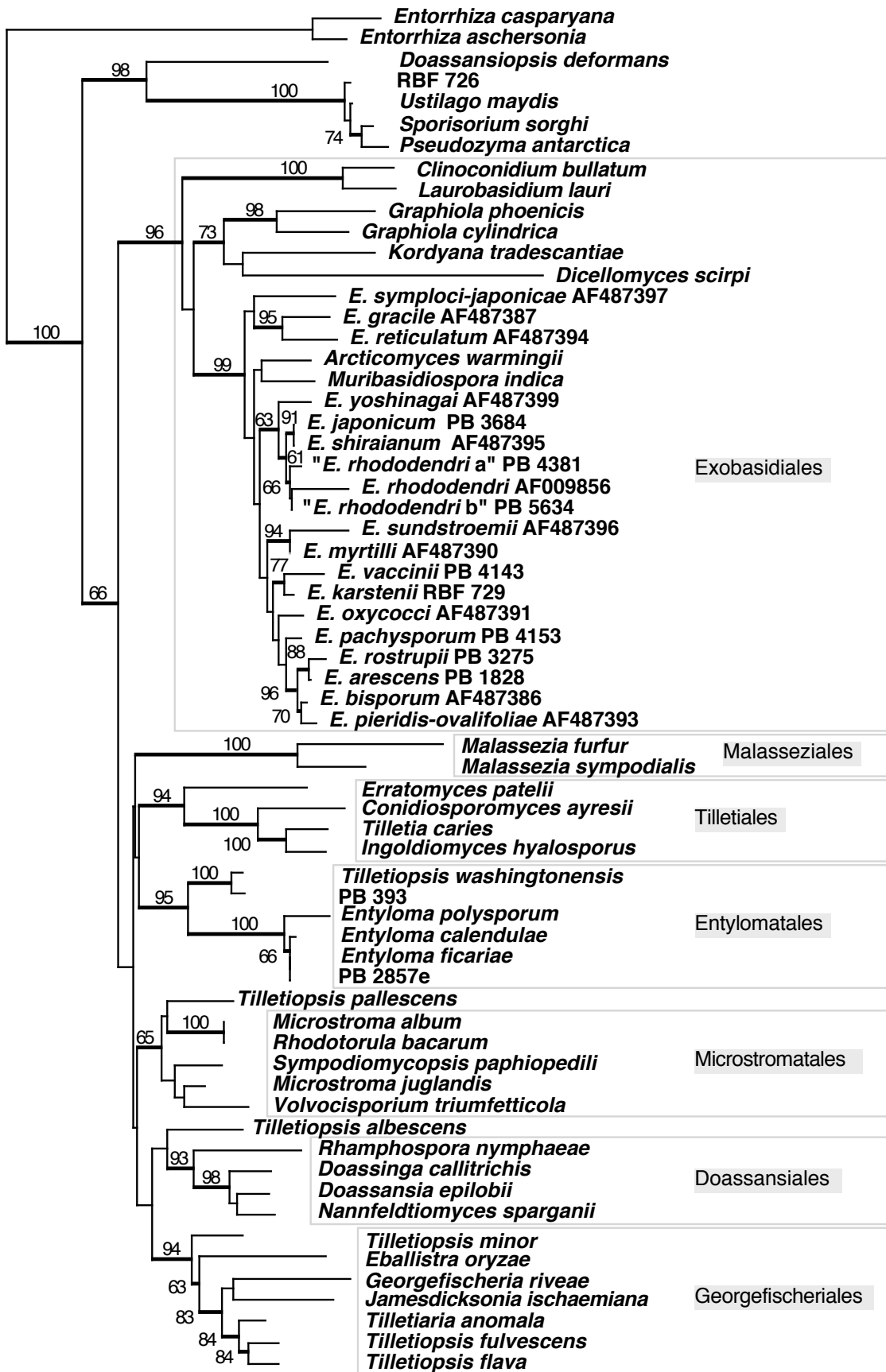


Abb.3.4-3

In der Bayes'schen Analyse wurden 600.000 Generationen durchlaufen, wobei innerhalb der Markov-Ketten 30-60% der vorgeschlagenen Parameterwechsel akzeptiert wurden und zwischen den Markov-Ketten in etwas über 10% der Generationen ein Wechsel stattfand. Aus den 5.300 gesammelten Bäumen aus dem Bereich höchster Likelihood-Werte (nach dem „Burnin“, siehe dazu Kapitel 2.3.4.3.2) wurde das Majority-Consensus-Dendrogramm der Bayes'schen Analyse (Abb.3.4-4) erstellt, in welchem die Häufigkeit einzelner Gruppierungen gleichzeitig deren „Posterior Probability“ widerspiegelt.

Die Ustilaginomycetidae stellen sich bei allen phylogenetischen Analysen als Schwestergruppe zu den Exobasidiomycetidae dar. Innerhalb der Ustilaginomycetidae bildet *Doassansiopsis deformans* (Urocystales) das Schwestertaxon zu den Vertretern der Ustilaginales. Die Sequenz des Stammes RBF 726 gruppiert innerhalb der letztgenannten Ordnung in der Nähe von *Ustilago maydis*.

Die sieben Ordnungen der Exobasidiomycetidae finden sich in den phylogenetischen Analysen immer als monophyletische Gruppen, die durch hohe Jackknife-Werte bzw. Wahrscheinlichkeiten unterstützt werden. *Tilletiopsis albescens* und *Tilletiopsis pallescens*, die momentan keiner der Ordnungen eindeutig zugeordnet werden (BEGEROW *et al.* 2000, BAUER *et al.* 2001b), sind auch in den hier vorgestellten Analysen an verschiedene Gruppen angeschlossen. *T. albescens* gruppiert entweder mit den Doassansiales oder Entylomatales, während *T. pallescens* eher eine Affinität zu den Microstromatales zeigt. Die beiden Stämme PB 393 und PB 2857e clustern, wie nach den Ergebnissen der BLAST-Suche zu erwarten war, mit den Vertretern der Entylomatales, und alle *Exobasidium* s.str.-Vertreter finden sich innerhalb der Exobasidiales. Die Beziehungen der Ordnungen zueinander stellen sich bei den unterschiedlichen Verfahren durchaus unterschiedlich dar. Es findet sich aber nirgendwo eine Absicherung einer spezifischen Großtopologie durch Unterstützungs- bzw. Wahrscheinlichkeitswerte. Während das Parsimony-Verfahren Abzweigungen einzelner Linien nacheinander - mit den Exobasidiales als am weitesten abgeleiteter Gruppe - zeigt, stellt die Distanzanalyse die Exobasidiales als Schwestergruppe zu allen anderen Exobasidiomycetidae dar. Auch die Bayes'sche Analyse löst die Beziehungen der Exobasidiomycetidae mit Schwestergruppenbeziehungen auf, doch sind hier die Exobasidiales nur die direkte Schwestergruppe zu den Microstromatales.

---

**Abb.3.4-4** Dendrogramm der Bayes'schen Analyse der Sequenzdaten der Domäne I der 26S rDNA bei Ustilaginomyceten. Das zugrundeliegende Alignment ist im Vergleich zu Abb.3.2.2-1 bis -3 in der Länge gekürzt. Aus 5.300 Einzelbäumen errechneter Majority-Consensus mit gemittelten Astlängen. Gewurzelt mit *Entorrhiza* spp. als Außengruppe. Äste mit Wahrscheinlichkeiten von über 60% sind hervorgehoben und die Werte sind angegeben.

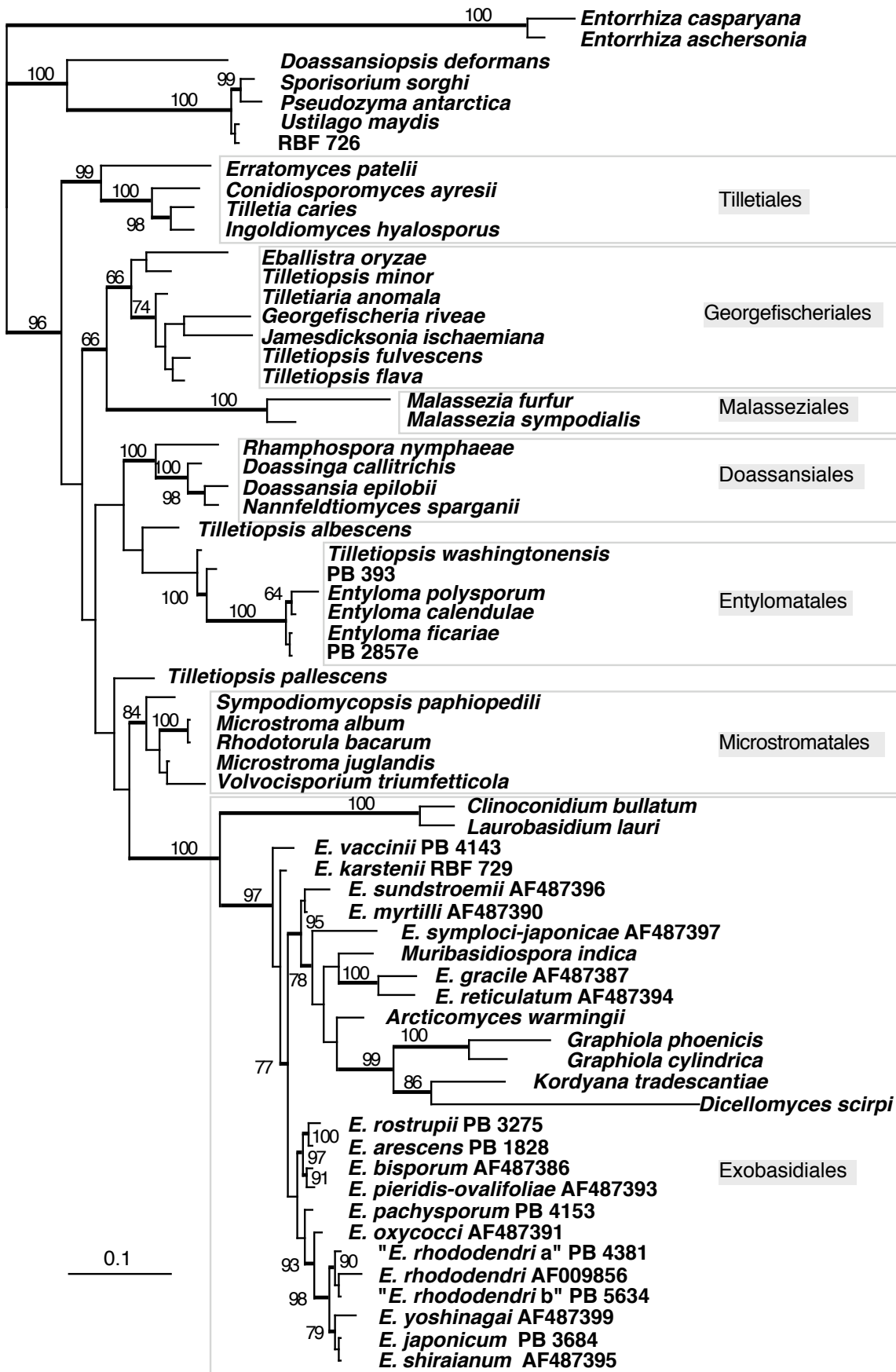


Abb.3.4-4

Innerhalb der Exobasidiales clustern die beiden Gattungen der Brachybasidiaceae (*Dicellomyces* L.S.Olive und *Kordyana*) immer gemeinsam und bilden die Schwestergruppe zu den beiden *Graphiola*-Arten (Graphiolaceae). Ebenso gruppieren die beiden Vertreter der Cryptobasidiaceae (*Clinoconidium* Pat. und *Laurobasidium*) immer zusammen. Diese Beziehungen haben zumeist auch hohe Unterstützungs- bzw. Wahrscheinlichkeitswerte. Im Gegensatz dazu finden sich die Exobasidiaceen (*Arcticomycetes*, *Exobasidium* und *Muribasidiospora*) nur in den Distanzanalysen als monophyletische Gruppe, während sich in der Parsimony- und Bayes'schen Analyse die Graphiolaceen - Brachybasidiaceen-Gruppe innerhalb der Exobasidiaceen findet. Auch die Vertreter der Gattung *Exobasidium* selbst bilden in keiner dieser phylogenetischen Analysen eine monophyletische Gruppe, da zumindest *Arcticomycetes warmingii* und *Muribasidiospora indica* zwischen den *Exobasidium*-Arten stehen. Allerdings bleiben diese Beziehungen in allen phylogenetischen Analysen ohne Absicherung durch mit statistischen Verfahren ermittelte Unterstützungs- bzw. Wahrscheinlichkeitswerte. Nur *E. gracile* und *E. reticulatum*, die beiden Arten von *Camellia* (*Thea*) spp., gruppieren immer mit hoher Absicherung zusammen. In allen Dendrogrammen, unabhängig vom Verfahren, findet sich sodann noch eine Gruppe aller Exobasidien von *Rhododendron*-Arten, allerdings ohne Absicherung. Die Exobasidien der Vaccinioideen bilden nur in den Distanzanalysen eine geschlossene Gruppe; einzig eine Vierer-Gruppierung von *E. arescens* mit *E. bisporum*, *E. pieridis-ovalifoliae* und *E. rostrupii* findet sich immer.

### **3.5 Sequenzvergleich der 18S rDNA ausgewählter Stämme im Kontext der Basidiomycota**

#### **3.5.1 Größenunterschiede der PCR-Produkte zeigen Insertionen in der 18S rDNA an**

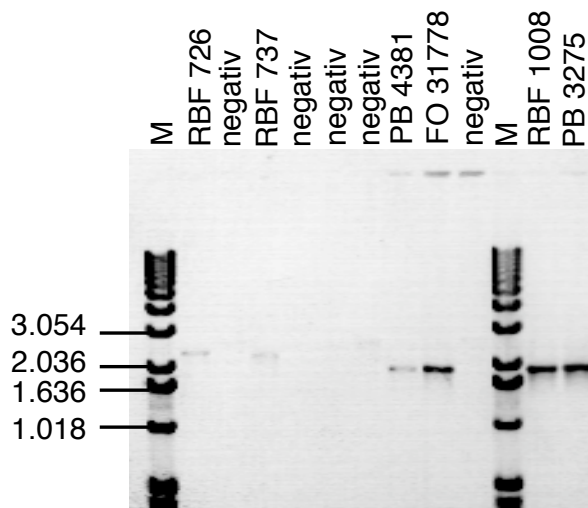
Um die Ursache für die in den PCR-RFLPs gefundenen, unerwarteten Unterschiede in den genetischen Distanzen zu klären, wurde parallel mit der 26S rDNA-Sequenzanalyse eine ergänzende phylogenetische Analyse der 18S rDNA ausgewählter Stämme durchgeführt.

Die mit dem Primerpaar A/B (siehe Tab.2.2.3.1-1) durchgeführten PCR-Reaktionen sollten etwa 1.800 bp große PCR-Produkte liefern. Ein homologes PCR-Produkt von *Saccharomyces cerevisiae* hat eine Größe von 1.791 bp - berechnet nach dem GENBANK-Eintrag J01353 (siehe Anhang I). Es wurden aber bei den untersuchten *Exobasidium*-Stämmen unterschiedliche Größen der fast die gesamte 18S rDNA umfassenden Amplifikate gefunden. Neben den erwarteten 1.8 kb großen Banden waren auf den PCR-Kontrollgelen auch solche von etwa 2.3 kb und 2.5 kb zu erkennen (Tab.3.5.1-1, Abb.3.5.1-1). Die Überlängen dieser PCR-Produkte von etwa 500 bzw. 700 bp sind vermutlich auf Group-I-Introns

zurückzuführen, deren Vorkommen als verbreitetes Phänomen in den 18S rRNA-Genen aller höheren Pilze in den letzten 10 Jahren nachgewiesen wurde (u.a. DE WACHTER *et al.* 1992, DEPRIEST & BEEN 1992, TANABE *et al.* 2002).

**Tab.3.5.1-1: Größe der 18S rDNA PCR-Produkte bei ausgewählten Stämmen mit dem Primerpaar A/B.** Rund 1.8 kb große, insertionsfreie PCR-Produkte (-) sind insertionshaltigen PCR-Produkten (+) mit 2.3 bis 2.5 kb Größe gegenübergestellt. Wirtspflanzen, Zugehörigkeit zu RFLP-Gruppen sowie Eingruppierung dieser RFLP-Gruppen aufgrund der 26S rDNA-Partialsequenzen sind angegeben.

Stamm	Wirt	RFLP	Seq. Domäne I	Insertion(en)
F0 31778	<i>V. uliginosum</i>	IV	<i>E. pachysporum</i> -Gr.	-
PB 383	<i>V. uliginosum</i>	I	Entylomatales	-
PB 393 = RBF 1008	<i>V. vitis-idaea</i>	I	Entylomatales	-
PB 3275	<i>V. oxycoccos</i>	II	<i>E. rostrupii</i> -Gr.	-
PB 4153	<i>V. uliginosum</i>	IV	<i>E. pachysporum</i> -Gr.	-
PB 4381	<i>Rh. hirsutum</i>	XI	„ <i>E. rhododendri a</i> “-Gr.	-
PB 2857e	<i>Rh. x intermedium</i>	VII	Entylomatales	+
PB 4380	<i>Rh. ferrugineum</i>	VIII	„ <i>E. rhododendri b</i> “-Gr.	+
RBF 726	<i>V. vitis-idaea</i>	VI	Ustilaginales	+
RBF 737	<i>V. uliginosum</i>	XV	nicht bestimmt	+



**Abb.3.5.1-1: PCR-Produkte mit dem Primerpaar A/B.** Ausschnitt aus einem 0,8%igen Agarosegel mit Banden von 1.8 und 2.3 kb Größe. DNA-Größenstandard (M) = 1kb DNA-Leiter, Stammnummern angegeben, negativ = Spuren ohne erfolgreiche Amplifikation.

Die PCR-Produkte mit dem Primerpaar A/B waren von unterschiedlicher Qualität. Insgesamt konnten von 10 Stämmen Amplifikate der 18S rDNA erhalten werden. Die insertionshaltigen PCR-Produkte waren i.d.R. von geringer Ausbeute (Abb.3.5.1-1). Die beiden in verschiedenen Stammsammlungen gehaltenen Kulturen eines Pilz-Isolates zeigten auch hier wieder, wie nicht anders zu erwarten, gleich große PCR-Produkte (PB 393 und RBF 1008, siehe auch Tab.3.1.2-1).

### 3.5.2 18S rDNA-Sequenzen ausgewählter Stämme

Zur Sequenzierung wurden neben PCR-Produkten des Primerpaares A/B für den 3'-Bereich der 18S rDNA auch solche des Primerpaares NS23UCB/ITS4 verwendet (siehe Tab.2.2.3.1-1). Ausgewählt zum Sequenzieren wurden drei insertionsfreie PCR-Produkte von Stämmen, welche die in den PCR-RFLP-Analysen der 26S rDNA gefundenen Distanzunterschiede widerspiegeln, zum einen je ein *Exobasidium* s.str.-Stamm von *V. oxycoccus* (PB 3275, *E. rostrupii*-Gruppe) und von *Rh. hirsutum* (PB 4381, „*E. rhododendri* a“-Gruppe), zum anderen ein Stamm aus der deutlich abseits stehenden RFLP-Gruppe I (RBF 1008, Entylo-matales).

Die sequenzierten 18S rDNA-Amplifikate ohne PCR-Primerbindungsstellen entsprechen den Positionen 22 bis 1.774 der 18S rDNA von *Saccharomyces cerevisiae*. Sie haben bei den untersuchten Stämmen folgende Größen: Stamm PB 3275 hat 1.768 bp, Stamm PB 4381 hat 1.770 bp und Stamm RBF 1008 besitzt 1.755 bp. Vergleicht man diese drei Sequenzen nach dem Erstellen eines Alignments miteinander, so ergibt sich ein Bild, das den oben geschilderten 26S rDNA-Analysen entspricht. Die Sequenzen der Stämme PB 3275 und PB 4381 sind wesentlich ähnlicher untereinander als zu der von Stamm RBF 1008. Stamm PB 4381 unterscheidet sich von PB 3275 in insgesamt 12 Positionen. Stamm RBF 1008 hingegen unterscheidet sich von der gemeinsamen Sequenz der beiden anderen Stämme in 88 Positionen (Substitutionen und Indels). In den 12 Positionen, die zwischen PB 4381 und PB 3275 verschieden sind, ist RBF 1008 zusätzlich an zwei Positionen von beiden verschieden. Diese Sequenzunterschiede korrelieren mit den unterschiedlichen genetischen Distanzen der 26S rDNA-Analysen.

### 3.5.3 Phylogenetische Analyse von 18S rDNA-Daten

In den Sequenzdatenbanken lagen bisher keinerlei 18S rDNA-Einträge von *Exobasidium* spp. vor. Die gesamte Unterklasse der Exobasidiomycetidae ist mit nur wenigen Arten einiger Ordnungen vertreten. Die drei *Exobasidium*-Sequenzen wurden mit 21 Vergleichssequenzen

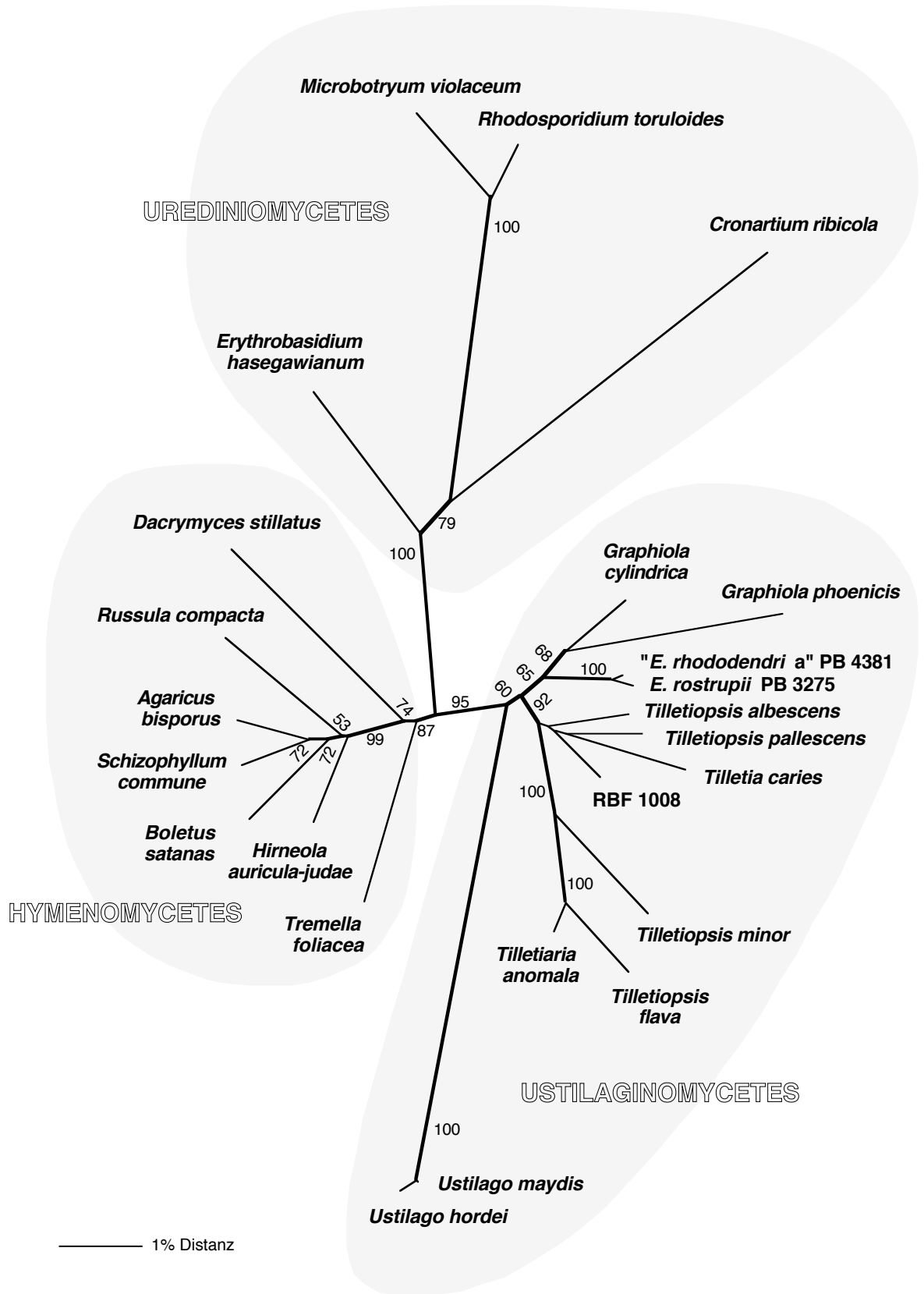


aus GENBANK (siehe Kapitel 2.3.4.3.3) in einem Alignment zusammengestellt. Aufgrund der unterschiedlichen Längen der Datenbankeinträge resultierte für die phylogenetische Analyse eine Datenmatrix, die den Positionen 51 bis 1.760 der 18S rDNA von *Saccharomyces cerevisiae* entspricht. Das Alignment (Anhang XV) umfaßt 1.764 Nukleotidpositionen, von denen 413 parsimony-informativ und 147 variabel, aber parsimony-uninformativ sind (Gaps als fehlende Daten gewertet). Allerdings sind nicht in allen Bereichen dieses Alignments alle Basenpositionen über alle Taxa zweifelsfrei homologisierbar. Die nicht eindeutigen Bereiche wurden von der phylogenetischen Analyse ausgeschlossen (201 Nukleotidpositionen, siehe Anhang XV), so daß eine Matrix mit einer Länge von 1.563 Positionen resultiert, die 398 variable Merkmalen enthält, von denen 278 parsimony-informativ sind.

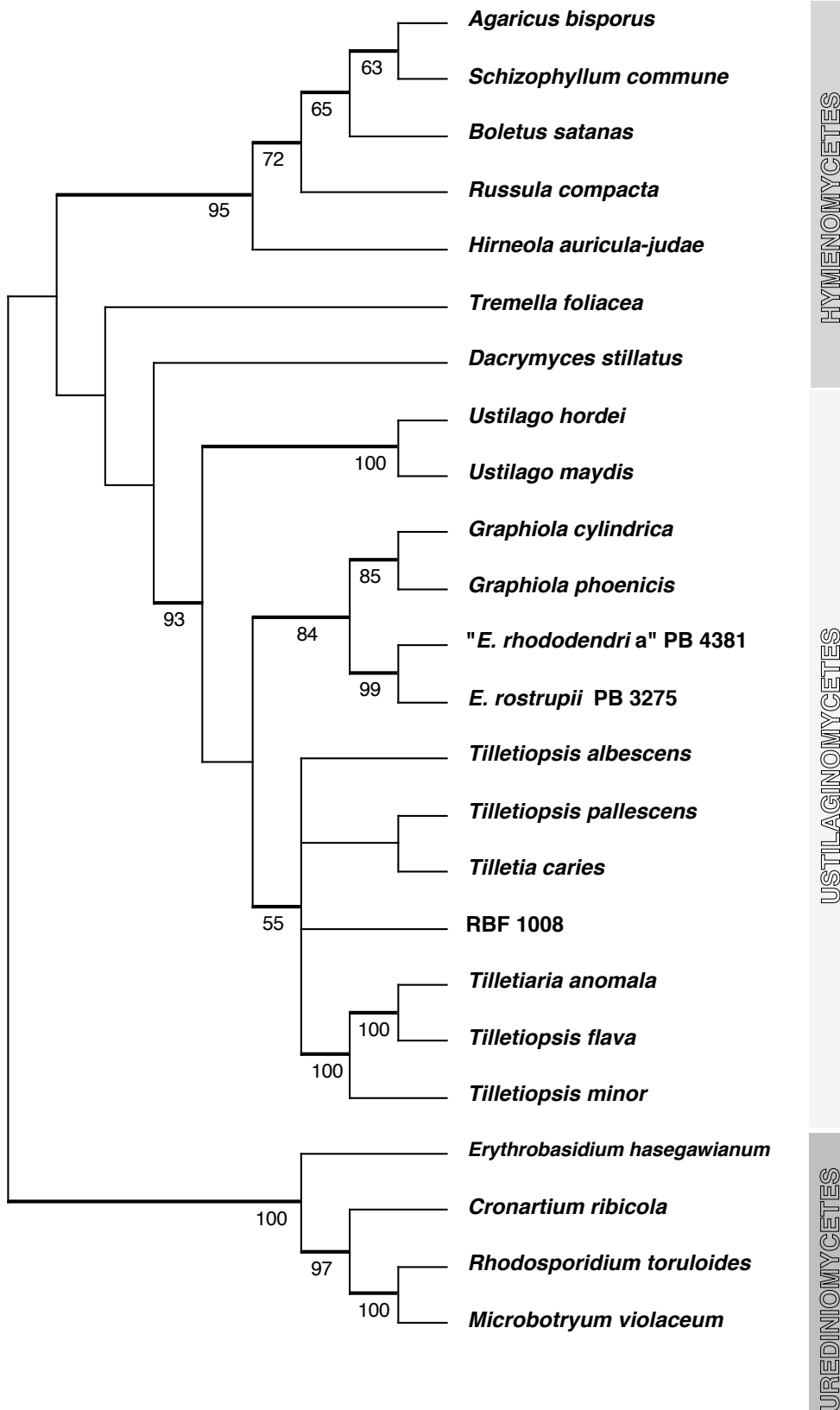
Die Vertreter der Klassen der Hymenomycetes und Urediniomycetes werden als ausreichend erachtet, um in den phylogenetischen Analysen der 18S rDNA-Daten die Stellung der hier untersuchten Stämme innerhalb der dritten Klasse der Basidiomycota, den Ustilaginomycetes, wiederzugeben. Auf die Einbeziehung von Außengruppen-Taxa von außerhalb der Basidiomycota wurde daher verzichtet. Für diese phylogenetische Analyse wurden Distanz- und Parsimony-Verfahren angewandt, für die Bootstrap- und Jackknife-Unterstützungen berechnet wurden. Auch bei dieser Auswertung liegen die Jackknife-Werte i.d.R. über den Bootstrap-Werten.

Für die Distanzanalyse wird hier ein Dendrogramm nach dem Jukes/Cantor-Modell vorgestellt (Abb.3.5.3-1). Sie zeigt deutlich eine Dreiteilung der Taxa gemäß der drei Klassen der Basidiomycota. Die zu diesen Klassen führenden Äste erhalten hohe Unterstützungswerte. Die drei hier analysierten Stämme clustern innerhalb der Ustilaginomyceten mit den übrigen Vertretern der Exobasidiomycetidae, die die Schwestergruppe zu den beiden *Ustilago*-Arten als Vertreter der Ustilaginomycetidae bilden. Auch diese Beziehung erhält eine gute statistische Absicherung.

Die Parsimony-Analyse ergab vier gleich sparsamste Bäume mit einer Gesamtlänge von 849 Schritten (CI = 0,608, RC = 0,412, RI = 0,677 und HI = 0,392) bei Berücksichtigung aller variablen Merkmale. Der strikte Consensus (Abb.3.5.3-2) zeigt im wesentlichen die gleiche Topologie wie die in der Distanzanalyse ermittelte. Allerdings ist die Stellung von *Dacrymyces stillatus* und *Tremella foliacea* abweichend, wobei die basalen Linien der Hymenomyceten in dem Parsimony-Verfahren weder eine gute Auflösung noch eine statistische Absicherung erfahren. Hingegen finden sich die Urediniomyceten und Ustilaginomyceten auch in der Parsimony-Analyse als Gruppen mit hohen Unterstützungswerten. Auch hier bilden die beiden *Ustilago*-Arten die Schwestergruppe zu den Exobasidiomycetidae, die wiederum die drei hier sequenzierten Stämme einschließen.



**Abb.3.5.3-1:** Dendrogramm einer Distanzanalyse mit Sequenzen der 18S rDNA. Jukes/Cantor-Modell und Neighbor-Joining, ungewurzelt. Äste mit Jackknife-Werten über 50% sind hervorgehoben und die Werte angegeben.



**Abb.3.5.3-2:** Consensus-Dendrogramm der Parsimony-Analyse von Sequenzen der 18S rDNA. Strikter Consensus aus vier gleich sparsamsten Bäumen, Midpoint Rooting. Äste mit Jackknife-Werten über 50% sind hervorgehoben und die Werte angegeben.

In der phylogenetischen Analyse der 18S rDNA-Daten gruppieren die Stämme PB 3275 und PB 4381 aus dem „Hauptcluster“ der PCR-RFLP-Analyse, welches mit dem Vergleich der 26S rDNA-Partialsequenzen als *Exobasidium* s.str. charakterisiert wurde, zusammen. Die Stämme der *E. rostrupii*- und der „*E. rhododendri* a“-Gruppe bilden die Schwestergruppe zu den beiden Vertretern der Gattung *Graphiola*, eine Beziehung welche v.a. mit dem Parsimony-Verfahren eine hohe statistische Absicherung erhält. Auch in der 18S rDNA-Analyse findet sich Stamm RBF 1008, der sich bei den 26S rDNA-Partialsequenzen als nächst ähnlich zu *Tilletiopsis*-Arten in der Ordnung Entylomatales zeigte, außerhalb der Exobasidiales in einer Gruppe mit Vertretern der Gattungen *Tilletia*, *Tilletiaria* und *Tilletiopsis*, die in der Distanzanalyse sehr hohe Unterstützungswerte erhält. In der Parsimony-Analyse zeigen die Arten in dieser Gruppe in den vier gleich sparsamsten Bäumen unterschiedliche Beziehungen zueinander, weshalb diese im strikten Consensus nicht aufgelöst ist. Die drei Vertreter der Georgerfischeriales (*Tilletiaria anomala*, *Tilletiopsis flava* und *Tilletiopsis minor*) clustern jedoch bei beiden Verfahren mit hoher Absicherung zusammen. *Tilletia caries* (Tilletiales) und *Tilletiopsis pallescens* (mit ungeklärter Stellung innerhalb der Exobasidiomycetidae, siehe auch Kapitel 3.4) bilden zwar auch immer eine Gruppe, aber diese Beziehung erhält keinerlei statistische Absicherung. Die in der Distanzanalyse dargestellten Beziehungen dieser Arten zueinander entsprechen einem der vier gleich sparsamsten Bäume der Parsimony-Analyse.

Die phylogenetische Analyse der 18S rDNA-Sequenzen bestätigt das mit den Partialsequenzen der 26S rDNA gewonnene Bild. Die in dieser Arbeit untersuchten und der Gattung *Exobasidium* zugeordneten Stämme bilden keine monophyletische Gruppe. Es gibt Stämme, die Affinitäten zu anderen Ordnungen der Ustilaginomyceten zeigen. Vertreter von *Exobasidium* s.str. stehen phylogenetisch in dieser 18S rDNA-Analyse der Gattung *Graphiola* am nächsten.

### **3.6 Charakterisierung der ITS-Region ausgewählter Stämme**

Bei den Analysen der 26S rDNA-Partialsequenzen gruppieren Stämme mit hoher Sequenzhomologie zusammen. Innerhalb dieser Gruppen fanden sich bei einem paarweisen Vergleich maximal zwei unterschiedliche Basenpositionen (siehe Abb.3.2.2-1 und -2). Da damit kaum eine weitere Differenzierung zwischen diesen Stämmen möglich ist, sollte mit einer kurzen Charakterisierung der ITS-Region das Potential dieses als variabel geltenden Markers (siehe Einleitung) für eine Differenzierung zwischen den untersuchten Stämmen getestet werden.

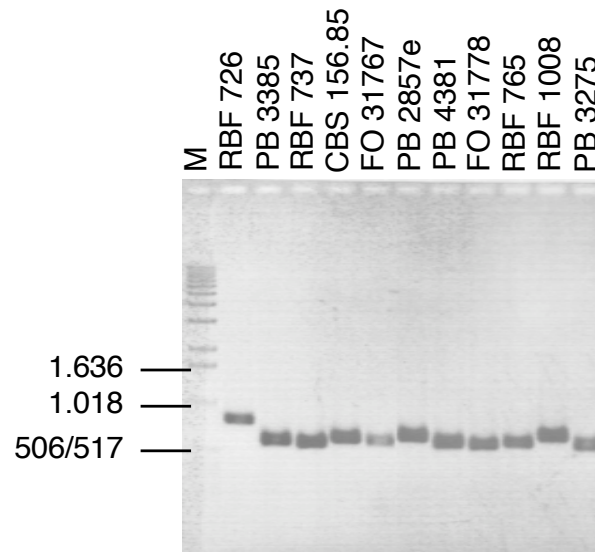
### Größenunterschiede bei PCR-Produkten mit dem Primerpaar ITS5/ITS4

Die ITS-Region wurden mit der Primerkombination ITS5/ITS4 (siehe Tab.2.2.3.1-1) amplifiziert. In diesen PCR-Produkten sind inklusive der Primerbindungsstellen, bezogen auf *Saccharomyces cerevisiae* als Standard (siehe Anhang I), 54 bp vom 3'-Ende der 18S rDNA und 60 bp vom 5'-Beginn der 26S rDNA enthalten (siehe auch Abb.2.2.3.1-1).

Die PCR-Amplifikate der untersuchten Stämme waren nicht einheitlich. Auf PCR-Kontrollgelen waren Banden von etwa 600, 700 und 800 bp Länge zu erkennen (Tab.3.6-1, Abb.3.6-1). Im Gegensatz zu den 26S rDNA PCR-Produkten treten hier aber keine distinkten Größenklassen auf, sondern PCR-Produkte mit etwas variierenden Größen in den genannten Bereichen. Von 16 Stämmen wurden Amplifikate der ITS-Region erhalten. Die Verteilung der PCR-Produktgrößen der ITS-Region entspricht weitgehend den gefundenen Gruppierungen der Stämme aufgrund der 26S rDNA-Daten. Nur Stamm CBS 156.85, der innerhalb von *Exobasidium* s.str. steht, zeigt hier in der Größe seines ITS-Amplifikates ein abweichendes Verhalten, indem er den Stämmen ähnelt, die als Vertreter der Entylomatales charakterisiert wurden. Diese zeigen um 700 bp große PCR-Produkte, während die Stämme der *Exobasidium* s.str.-Gruppe ansonsten nur etwa 600 bp große PCR-Produkte ergaben.

**Tab.3.6-1: PCR-Produktgrößen der ITS-Region bei ausgewählten Stämmen mit dem Primerpaar ITS5/ITS4.** Die in ihrer Größe leicht variierenden PCR-Produkte der verschiedenen Stämme werden drei Kategorien zugeordnet.

Stamm	Wirt	RFLP-Gr.	~ 600 bp	~ 700 bp	~ 800 bp
FO 31767	<i>Rh. ferrugineum</i>	XI	+		
FO 31778	<i>V. uliginosum</i>	IV	+		
PB 1828	<i>V. myrtilus</i>	III	+		
PB 3275	<i>V. oxycoccos</i>	II	+		
PB 3385	<i>V. vitis-idaea</i>	V	+		
PB 4153	<i>V. uliginosum</i>	IV	+		
PB 4380	<i>Rh. ferrugineum</i>	VIII	+		
PB 4381	<i>Rh. hirsutum</i>	XI	+		
PB 5634	<i>Rh. x intermedium</i>	IX	+		
RBF 737	<i>V. uliginosum</i>	XV	+		
RBF 765	<i>V. vitis-idaea</i>	V	+		
CBS 156.85	<i>Thea sinensis</i>	XVI		+	
PB 383	<i>V. uliginosum</i>	I		+	
PB 2857e	<i>Rh. x intermedium</i>	VII		+	
RBF 1008	<i>V. vitis-idaea</i>	I		+	
RBF 726	<i>V. vitis-idaea</i>	VI			+



**Abb.3.6-1:** PCR-Produkte mit dem Primerpaar ITS5/ITS4. Ausschnitt aus einem 0,8%-igen Agarosegel mit Banden von ca. 600, 700 und 800 bp Größe. DNA-Größenstandard (M) = 1kb DNA-Leiter, Stammnummern angegeben.

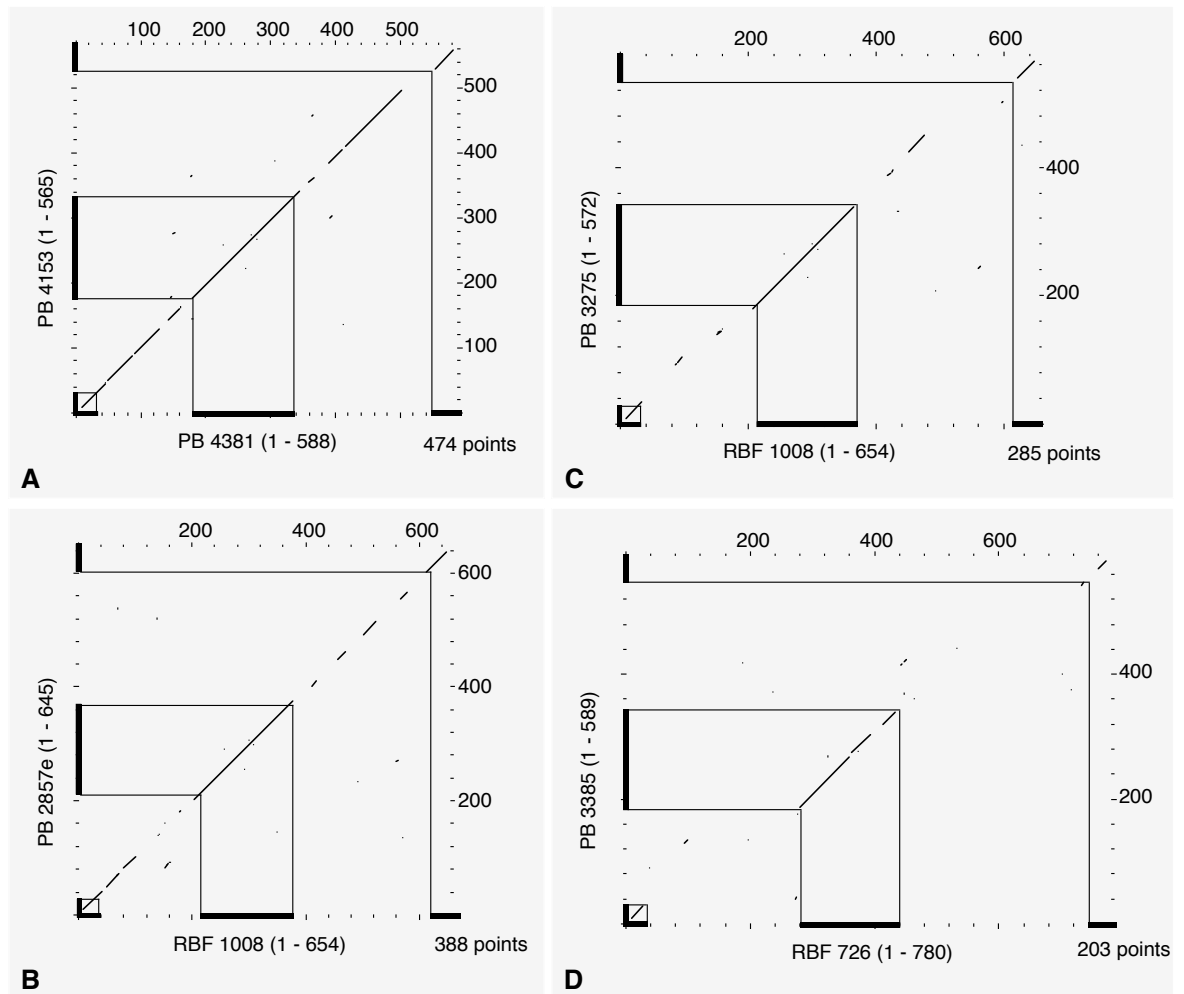
### Sequenzvergleich der ITS-Region

Sequenzierreaktionen wurden zusätzlich auch von PCR-Produkten der Primerkombination NS23UCB/ITS4 (siehe Tab.2.2.3.1-1) angefertigt. Es wurden Sequenzen der ITS-Region von 13 Stämmen ausgewertet (Tab.3.6-2). Durch einen Vergleich der gewonnenen Sequenzen (Anhang XVI) mit den kodierenden rDNA-Abschnitten von *Saccharomyces cerevisiae* (siehe Anhang I) wurden über die angrenzenden Basen der rRNA-Gene die genauen Abgrenzungen der beiden internen transkribierten Spacer ITS 1 und ITS 2 definiert. Der Vergleich der Sequenzen ergibt, daß die Größenunterschiede nicht innerhalb der enthaltenen kodierenden rDNA-Abschnitte begründet liegen, und es sich somit hier nicht um Introns handeln kann. Die ungleichen Längen der PCR-Produkte sind auf Unterschiede in den beiden internen transkribierten Spacern selbst zurückzuführen.

**Tab.3.6-2:** **Länge der einzelnen Abschnitte der ITS-Region.** Die Längen wurden aus den Sequenzdaten ermittelt. Die Stämme sind nach den Größen ihrer PCR-Produkte (inklusive Primerbindungsstellen) aufgelistet (PCR). Zugehörigkeit zu RFLP-Gruppen (RFLP) sowie Eingruppierung dieser RFLP-Gruppen aufgrund der 26S rDNA-Partialesequenzen (Seq. Domäne I) sind angegeben. Stämme mit identischen Sequenzen sind zusammengruppiert. ITS-Region: ITS = ITS 1+5.8S rDNA+ITS 2. Alle Größenangaben in bp.

Stamm	RFLP	Seq. Domäne I	PCR	ITS	ITS 1	5.8S	ITS 2
F0 31778	IV	<i>E. pachysporum</i> -Gruppe	607	493	144	158	191
PB 4153	IV	<i>E. pachysporum</i> -Gruppe	607	493	144	158	191
PB 3275	II	<i>E. rostrupii</i> -Gruppe	614	500	151	158	191
PB 4380	VIII	„ <i>E. rhododendri</i> b“-Gruppe	620	506	148	158	200
PB 5634	IX	„ <i>E. rhododendri</i> b“-Gruppe	620	506	148	158	200
PB 1828	III	<i>E. arescens</i> -Gruppe	623	509	151	158	200
PB 4381	XI	„ <i>E. rhododendri</i> a“-Gruppe	630	516	148	158	210
FO 31767	XI	„ <i>E. rhododendri</i> a“-Gruppe	630	516	148	158	210
PB 3385	V	<i>E. vaccinii</i> -Gruppe	631	517	154	158	205
PB 2857e	VII	Entylomatales	687	573	177	158	238
PB 383	I	Entylomatales	696	582	178	158	246
RBF 1008	I	Entylomatales	696	582	178	158	246
RBF 726	VI	Ustilaginales	822	709	247	159	303

Um festzustellen, ob es sich bei den auftretenden Längenunterschieden der Spacer um größere Insertionen an diskreten Positionen handelt oder ob hier über die Länge der Spacer Insertions-Deletions-Ereignisse verteilt sind, wurden mit dem Programm „Compare“ (GCG-Programmpaket) paarweise Vergleiche durchgeführt, die zwei Sequenzen über ihre gesamte Länge auf Ähnlichkeiten hin prüfen (die Primerbindungsstellen wurden von diesen Analysen ausgeschlossen). Abb.3.6-2 zeigt einige Beispiele für die graphische Darstellung der Ergebnisse durch das Programm „DotPlot“ (GCG-Programmpaket). Bei diesen Analysen zeigen die kodierenden rDNA-Abschnitte erwartungsgemäß immer hohe Ähnlichkeiten. Die Spacerbereiche hingegen zeigen nur beim paarweisen Vergleich von etwa gleich langen Sequenzen Übereinstimmungen. Zwischen den kürzeren Sequenzen von *Exobasidium* s.str.-Stämmen sind diese sehr hoch, und im Plot ergibt sich dementsprechend nahezu eine durchgehende Diagonale (Abb.3.6-2A). Zwischen zwei unterschiedlichen von den längeren Sequenzen der Stämme, die den Entylomatales zugeordnet wurden, sind die Übereinstimmungen schon deutlich geringer, und es findet sich keine durchgehende Diagonale mehr (Abb.3.6-2B). Im Bereich des ersten Spacer sind die Übereinstimmungen dabei geringfügig größer als im zweiten Spacer. Beim paarweisen Vergleich unterschiedlich langer Sequenzen finden sich zwischen Sequenzen von rund 600 bp großen PCR-Produkten und solchen mit rund 700 bp Größe nur noch vereinzelt Übereinstimmungen innerhalb der Spacer (Abb.3.6-2C). Zwischen der längsten Sequenz von Stamm RBF 726 und allen kürzeren Sequenzen zeigen sich schließlich außerhalb der kodierenden rDNA-Abschnitte gar keine Übereinstimmungen mehr, und im Plot finden sich daher nur noch in den rDNA-Abschnitten in der Diagonalen Einträge, wobei hier sogar innerhalb der 5.8S rRNA Unterschiede vorhanden sind (Abb.3.6-2D).

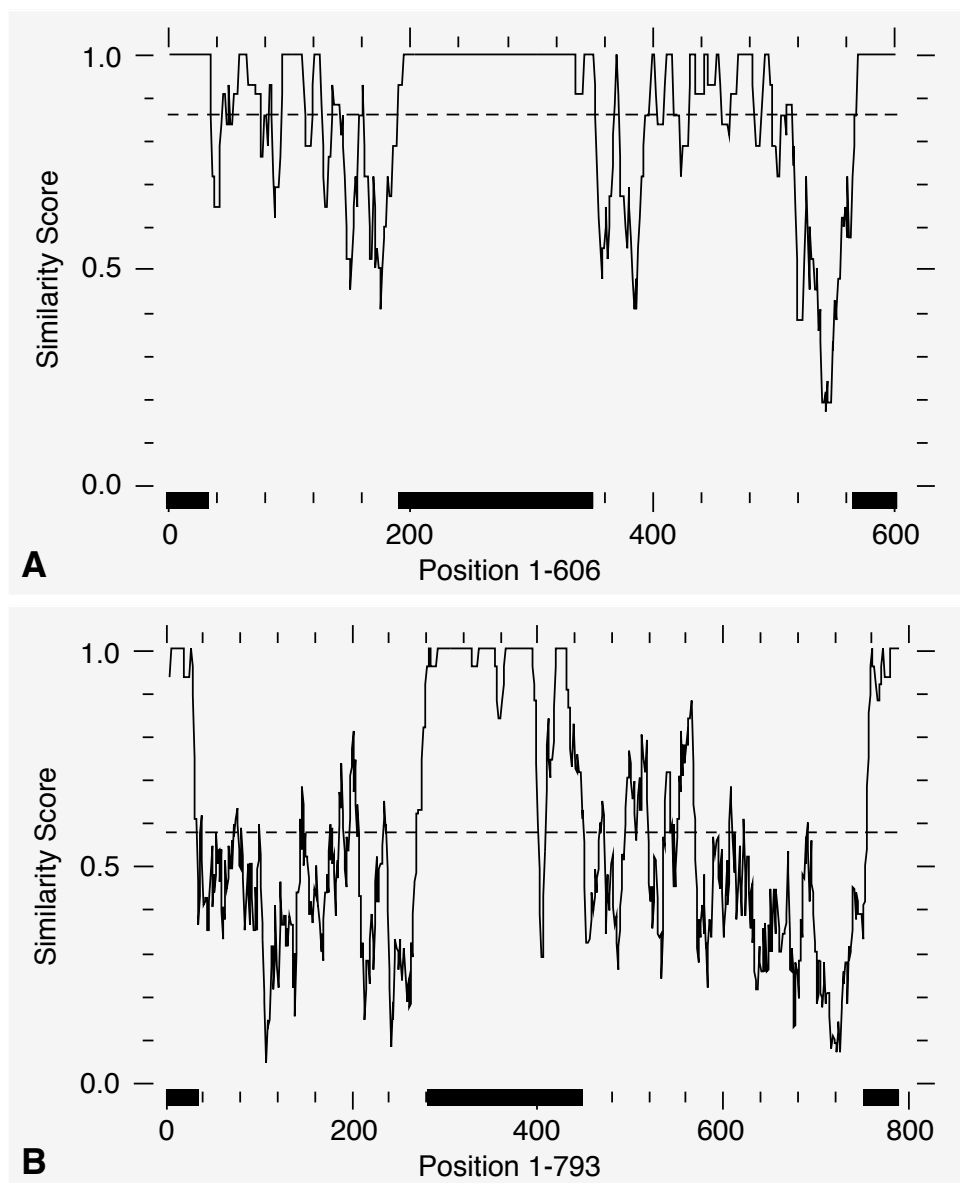


**Abb.3.6-2:** Darstellung der Ähnlichkeit ausgewählter ITS-Sequenzen im paarweisen Vergleich mit „DotPlot“. Die kodierenden rDNA-Abschnitte sind in den Sequenz-Achsen schwarz unterlegt und die zugehörigen Bereiche in den Plots abgegrenzt. Parameter der Analyse: „window size“ = 16, „stringency“ = 12. **A.** Plot zweier Sequenzen von *Exobasidium* s.str.-Stämmen. **B.** Plot zweier Sequenzen von den Entylomatales zugeordneten Stämmen. **C.** Plot einer *Exobasidium* s.str.- gegen eine Entylomatales-Sequenz. **D.** Plot der RBF 726- gegen eine *Exobasidium* s.str.-Sequenz.

Die Plots der Sequenzähnlichkeiten ergeben somit keinerlei Hinweise auf distinkte Insertionen als Ursache für die unterschiedlichen Größen der PCR-Produkte, sondern sie illustrieren eine fehlende Übereinstimmung bzw. vorhandene Heterogenität der Sequenzen über die gesamte Länge der beiden internen transkribierten Spacer. Die Verteilung schon allein der Längenunterschiede macht ein Homologisieren der sich als sehr heterogen erweisenden Spacer-Sequenzen äußerst schwierig. Hierzu wurden Alignments automatisch erstellt („PileUp“, GCG-Programmpaket, Sequenzen ohne Primerbindungsstellen verrechnet). Diese fallen in Abhängigkeit von den gewählten Parametern („gap creation penalty“ und



„gap extension penalty“) und den verrechneten Sequenzen bei den Sequenzheterogenitäten sehr unterschiedlich aus, was auch über „PlotSimilarity“ (GCG-Programmpaket) mit einer Darstellung der Gesamtähnlichkeit aller Sequenzen in einem Alignment graphisch gezeigt werden kann (Abb.3.6-3).



**Abb.3.6-3: Darstellung der Gesamtähnlichkeit automatischer Alignments der ITS-Region mit „PlotSimilarity“ an zwei Beispielen.** Kodierende rDNA-Abschnitte sind in der Sequenz-Achse schwarz unterlegt. Parameter: „PileUp“ - „gap creation penalty“= 0,0, „gap extension penalty“= 0,5. „PlotSimilarity“ - „window size“= 7. **A.** Alignment von vier kurzen *Exobasidium* s.str.-Sequenzen: PB 3275, PB 3385, PB 4153, PB 4381. Durchschnittliche Ähnlichkeit der Sequenzen im Alignment: 87%. **B.** wie Alignment A, erweitert um PB 2857e, RBF 1008 und RBF 726. Durchschnittliche Ähnlichkeit der Sequenzen im Alignment: 58%.

Die konservierteren Bereiche der rRNA-Gene sind darin deutlich zu erkennen und von den Spacern abgesetzt. Ein eindeutiges Alignment der Sequenzen der Spacer mit unterschiedlichen Größen ist nicht möglich. Innerhalb der Unterklasse der Exobasidiomycetidae sind die Sequenzunterschiede zu groß, und die notwendigen Indels können nicht eindeutig definiert werden. Nur innerhalb der Stämme von *Exobasidium* s.str. kann sowohl automatisch als auch manuell ein sinnvolles Alignment erstellt werden (Anhang XVI: Alignment 1). Streckenweise findet sich hier auch bei den alignierten Sequenzen der Spacer noch eine Gesamtähnlichkeit von 100% (Abb.3.6-3A). Schon innerhalb der den Entylomatales zugeordneten Stämme ist für ein Alignment der ITS-Sequenzen das Einfügen von mehr Indels notwendig (Anhang XVI: Alignment 2). Die wesentlich längere Sequenz von Stamm RBF 726 (Anhang XVI: 3. Teil) kann mit keiner der übrigen Sequenzen in einem Alignment direkt sinnvoll verglichen werden (siehe auch Abb.3.6-3B, wo die Gesamtähnlichkeit in weiten Bereichen der Spacer unter 50% und in einigen Alignmentabschnitten sogar unter 10% liegt). Zwischen Vertretern unterschiedlicher Ordnungen bzw. sogar Unterklassen der Ustilaginomyceten kann eine phylogenetische Auswertung der hier gewonnenen ITS-Sequenzdaten daher nicht durchgeführt werden. Aufgrund der Alignmentschwierigkeiten wäre auch das Hinzuziehen von Außengruppen-Taxa schwierig. Innerhalb der Exobasidiales selbst liegen keinerlei Daten zum weiteren Vergleich in GENBANK vor.

Ein Vergleich der ITS-Sequenzen nur von Vertretern der *Exobasidium* s.str.-Gruppe zeigt bei einfachen paarweisen Distanzanalysen („DnaDist“ in PHYLIP), die auf der Grundlage automatisch erstellter Alignments durchgeführt wurden, eine Affinität von PB 4380/PB 5634 zu PB 4381/FO 31767, von PB 4153/FO 31778 zu PB 3385 und von PB 1828 zu PB 3275, was den Analysen der Domäne I der 26S rDNA entspricht. Interessant ist hierbei die Beobachtung, daß solche Analysen durch den zweiten internen transkribierten Spacer geprägt werden. Werden ITS 1 und ITS 2 getrennt analysiert, so ergeben sich leicht unterschiedliche Beziehungen, während eine Analyse der gesamten ITS-Region immer den mit ITS 2 alleine erzielten Ergebnissen entspricht. Dies korreliert auch mit der Verteilung der Anzahl variabler Merkmale (Anhang XVI: Alignment 1). Innerhalb des ersten Spacers sind nur 46, innerhalb des zweiten Spacers aber 82 Positionen variabel (Substitutionen und Indels). Auch ist der zweite Spacer mit 191 bis 205 bp immer deutlich länger als der erste Spacer, der nur 144 bis 154 bp besitzt. Die höhere Variabilität des zweiten Spacers bei den Exobasidien ist auch in den DotPlots und Alignmentvergleichen (Abb.3.6-2A und -3A) erkennbar.

Auch wenn die ITS-Sequenzen über alle untersuchten Stämme gesehen sehr heterogen sind, so erwiesen sich doch die ITS-Sequenzen einiger Stämme als identisch (siehe Tab. 3.6-2). Dies sind zum einen die zwei Vertreter aus je einer RFLP-Gruppe (I, IV, XI) und zum anderen die in den PCR-RFLP-Analysen aufgetrennten Stämme der DNA-DNA-Homologie-Gruppe F (PB 4380, PB 5634), die auch in den Sequenzen der Domäne I der 26S rDNA

sehr hohe Ähnlichkeit zueinander aufwiesen und dort als „*E. rhododendri* b“-Gruppe charakterisiert wurden. Während sie dort immerhin zwei unterschiedliche Basenpositionen zeigten, sind sie hier sogar völlig identisch. Die Vertreter der übrigen analysierten RFLP-Gruppen zeigen jeweils individuelle, d.h. sie unterscheidende ITS-Sequenzen. Damit wird für die DNA-DNA-Homologie-Gruppe B die in den 26S rDNA-Analysen gefundene Auftrennung in die *E. arescens*- und die *E. rostrupii*-Gruppe hier über die ITS-Sequenzen bei den Stämmen PB 1828 und PB 3275 nochmals bestätigt.

Für die ITS-Sequenzen der über die 26S rDNA-Analysen den Entylomatales bzw. Ustilaginales zugeordneten Stämme wurden nächst ähnliche Sequenzen in GENBANK mit einer BLAST-Suche ermittelt (Tab.3.6-3), wobei als Suchsequenz die ITS-Region ohne flankierende 18S und 26S rDNA-Abschnitte eingesetzt wurde. Stamm RBF 726 zeigt auch in der ITS-Sequenz wiederum höchste Übereinstimmung mit Vertretern der Ustilaginales, während die ITS-Sequenzen der Stämme der RFLP-Gruppen I und VII mit Vertretern der Entylomatales höchste Übereinstimmung aufweisen. Die ITS-Sequenzen zeigen damit die nach den phylogenetischen Analysen der 26S und 18S rDNA zu erwartenden Affinitäten.

**Tab.3.6-3: Ähnlichkeiten der ITS-Sequenzen von außerhalb *Exobasidium* s.str. stehenden Stämmen zu GENBANK-Einträgen.** Ergebnisse von BLAST-Suchen über alle DNA-Sequenzeinträge. Jeweils die drei GENBANK-Einträge mit den höchsten „Score“-Werten sind aufgelistet. Der „Score“-Wert gibt die Übereinstimmung zwischen Datenbankeintrag und Suchsequenz (= Stamm, mit Angabe der Zugehörigkeit zu RFLP-Gruppen und phylogenetischer Stellung nach 26S rDNA-Partialsequenzen) an.

Stamm	die drei ähnlichsten GENBANK-Einträge	Score
RBF 726 VI	<i>Pseudozyma prolifica</i> Bandoni AF294700, Ustilaginales	1235
Vertreter der Ustilaginales	<i>Pseudozyma prolifica</i> Bandoni AB089368, Ustilaginales	1233
	<i>Ustilago maydis</i> (DC.) Corda AF038826, Ustilaginales	1219
PB 2857e VII	„Basidiomycet von Bambus“ U65612, Basidiomycota	1051
Vertreter der Entylomatales	<i>Entyloma linariae</i> J.Schröt. AY081041, Entylomatales	837
	<i>Entyloma microsporum</i> (Unger) J.Schröt. AY081045, Entylomatales	797
PB 383 RBF 1008 I	<i>Tilletiopsis washingtonensis</i> Nyland AF294696, Entylomatales	1154
Vertreter der Entylomatales	<i>Tilletiopsis washingtonensis</i> Nyland AB025688, Entylomatales	1090
	<i>Sympodiomyces paphiopedili</i> Sugiy., Tokuoka & Komag. AB025698, Microstromatales	1086

## 4 Diskussion

### 4.1 Mit *Exobasidium*-Infektionen assoziierte anamorphe Pilze

Die Gattung *Exobasidium* ist arm an stabilen morphologischen Merkmalen, weshalb früh molekulare Marker eingesetzt wurden, um Arten zu charakterisieren. Dies waren GC-Wert und DNA-DNA-Homologie (BLANZ & OBERWINKLER 1983, BLANZ 1986, BLANZ & DÖRING 1995, siehe Anhang III und IV). Die an in Kultur genommenen Isolaten erhobenen molekularen Daten stehen teilweise in Widerspruch zu dem auf traditionellen Merkmalen basierenden Artkonzept, das von NANNFELDT (1981) vorgelegt wurde (dargestellt in Kapitel 1.2). In der vorliegenden Arbeit sind solche aus *Exobasidium*-infiziertem Pflanzengewebe gewonnene Isolate mit PCR-RFLP-Daten weitergehend charakterisiert und mit rDNA-Sequenzdaten phylogenetisch analysiert worden. Die PCR-RFLP-Daten korrelieren im allgemeinen mit den früher erhobenen molekularen Markern GC-Wert und DNA-DNA-Homologie (siehe Abb. 3.1.3.4-1/-2). Keine der RFLP-Gruppen umfaßt Stämme, die nach diesen Kriterien unterschiedlichen Arten zugeordnet wurden. Einer RFLP-Gruppe angehörende Stämme werden daher als konspezifisch betrachtet. Hier erstmals untersuchte Stämme lassen sich teilweise gemeinsam mit früher analysierten Stämmen in eine Gruppe einordnen, teilweise bilden sie eigene, zusätzliche RFLP-Gruppen. Überraschend an den PCR-RFLP-Daten ist jedoch bei einigen Stämmen, für welche aufgrund ihrer Herkunft oder der früheren Untersuchungen eine genetische Einheitlichkeit zu erwarten war (z.B. 'Einsporkulturen' oder Angehörige einer DNA-DNA-Homologie-Gruppe), die Aufteilung auf zwei getrennte RFLP-Gruppen. Auch zeigen die berechneten Distanzen zwischen den RFLP-Mustern verschiedener Gruppen auffallend unterschiedliche Größenverhältnisse. Die angeschlossenen, vergleichenden rDNA-Sequenzanalysen bieten hierfür zwei unterschiedliche Erklärungen: Die phylogenetische Stellung einiger Arten außerhalb der Gattung *Exobasidium* und das Auftreten von Group-I-Introns in der rDNA. Der erste Teil der Diskussion behandelt daher das Auftreten von pilzlichen Anamorphen in *Exobasidium*-Isolaten und die untersuchten Stämme, welche nach den hier vorgelegten Ergebnissen keine *Exobasidium*-Kulturen repräsentieren.

Die vorgestellten molekularen Daten charakterisieren die Stämme der drei RFLP-Gruppen I, VI und VII als Vertreter von Arten, die außerhalb *Exobasidium* s.str. und sogar in anderen Ordnungen der Ustilaginomycetes angesiedelt sind. Die durchgeführte phylogenetische Analyse der Domäne I der 26S rDNA (siehe Abb.3.4-1 bis -4) gruppiert die Stämme PB 2857e (RFLP-Gruppe VII) und PB 393 (RFLP-Gruppe I) innerhalb der Exobasidiomycetidae gemeinsam mit *Entyloma* spp. und *Tilletiopsis washingtonensis*, Arten die der

Ordnung Entylomatales angehören (siehe BAUER *et al.* 1997, BEGEROW *et al.* 2000). Stamm RBF 726 (RFLP-Gruppe VI) hingegen wird in die Unterklasse der Ustilaginomycetidae gestellt, zusammen mit Arten, die den Ustilaginales und Urocystales (*Doassansiopsis deformans*) zugeordnet werden (siehe BAUER *et al.* 1997, BEGEROW *et al.* 1997, BEGEROW *et al.* 2000). Diese Gruppierungen erhalten bei Bootstrap- bzw. Jackknife-Analysen Unterstützungswerte von über 80%. Der GENBANK-Vergleich der ITS-Sequenzen einiger Stämme dieser RFLP-Gruppen (siehe Tab.3.6-3) bestätigt diese getrennten phylogenetischen Positionen ebenso wie die 18S rDNA-Sequenzanalyse (siehe Abb.3.5.3-1/-2), in der Stamm RBF 1008 (= PB 393) deutlich getrennt von den Vertretern der Exobasidiales (PB 3275, PB 4381 und zwei *Graphiola* spp.) mit Vertretern der Gattungen *Tilletia*, *Tilletiaria* und *Tilletiopsis* gruppiert. Tab.4.1-1 gibt einen Überblick über die aus der Gattung *Exobasidium* auszuschließenden RFLP-Gruppen bzw. Stämme.

**Tab.4.1-1: Auflistung der Stämme, die aufgrund von molekularen Daten den Ordnungen Entylomatales und Ustilaginales zugeordnet werden.** Als konspezifisch betrachtete Stämme sind zusammengefaßt. Die *Exobasidium*-infizierten Wirtspflanzen, von denen die Kulturen isoliert wurden (Wirt), die Zugehörigkeit zu DNA-DNA-Homologie-Gruppen (DNA), zu RFLP-Gruppen (RFLP), sowie die Länge der ITS-Region (ITS, in bp) ist der phylogenetischen Stellung nach Sequenzanalysen der Domäne I der 26S rDNA (Phylogenie) gegenübergestellt. . = keine Daten.

Stamm	Wirt	DNA	RFLP	ITS	Phylogenie
PB 383	<i>V. uliginosum</i>	A	I	582	Entylomatales
PB 393 = RBF 1008	<i>V. vitis-idaea</i>	A	I	582	
PB 3276	<i>V. oxycoccos</i>	A	I	.	
PB 2857e	<i>Rh. x intermedium</i>	E	VII	573	Entylomatales
'Einsporkulturen' PB 4898 z.T.	<i>Rh. spec.</i>	E	VII	.	
RBF 726	<i>V. vitis-idaea</i>	.	VI	709	Ustilaginales

In den PCR-RFLP-Ähnlichkeitsvergleichen sind dies die drei von dem „Hauptcluster“ der *Exobasidium*-Stämme abgesetzten Gruppen (siehe Abb.3.1.3.4-1/-2). Ihre phylogenetische Stellung spiegelt sich auch in der Unterstützung wieder, welche die *Exobasidium* s.str.-Gruppe einerseits und die Gruppierung der beiden Vertreter der Entylomatales andererseits bei dem „Enzym-Jackknifing“ der PCR-RFLP-Daten erhalten (siehe Abb.3.1.3.4-3). Die phylogenetischen Distanzen zwischen verschiedenen Ordnungen sind auch für die deutlichen Unterschiede in den ITS-Regionen verantwortlich, die ein sinnvolles Alignment noch nicht einmal zwischen den Vertretern zweier Ordnungen der Exobasidiomycetidae, den Exobasidiales und den Entylomatales, zulassen (siehe Abb.3.6-2 und -3), was auch bei der Analyse von ITS-Daten anderer Exobasidiomycetidae festzustellen ist (BEGEROW *et al.* 2002b).

### **Die RFLP-Gruppe VII wird als ein Vertreter der Entylomatales charakterisiert und so die Heterogenität der 'Einsporkulturen' von PB 4898 erklärt**

Die in ihren PCR-RFLP-Mustern unterschiedlichen 'Einsporkulturen' von PB 4898 finden sich in den RFLP-Gruppen VII in der intron-freien 2.2 kb Größenklasse (PB 4898-7, -19) und in der RFLP-Gruppe XIII in der 2.6 kb Größenklasse (PB 4898-17), welche durch ein Intron vom Typ a1 charakterisiert ist (siehe Abb.3.3-1). Da die Analyse der Domäne I der 26S rDNA nur einen der beiden analysierten Vertreter dieser 'Einsporkulturen' als Mitglied der Gattung *Exobasidium* ausweist (PB 4898-18, 2.6 kb Größenklasse), während der andere als Vertreter der Entylomatales charakterisiert wird (PB 4898-9, 2.2 kb Größenklasse), beruht die Einordnung dieser 'Einsporkulturen' in getrennte RFLP-Gruppen auch auf Unterschieden in kodierenden rDNA-Abschnitten und nicht nur auf dem durch das Intron hervorgerufenen Längenpolymorphismus. Die beiden RFLP-Gruppen zeigen dementsprechend bei allen Restriktionsenzymen in den PCR-RFLP-Analysen deutlich unterschiedliche Muster, die mit dem Auftreten einer einzelnen Insertion kaum erklärbar sind (vergleiche Tab.3.1.3.3-1).

Die hier untersuchten 'Einsporkulturen' von PB 4898 sind nicht alle miteinander konspezifisch; sie gehören unterschiedlichen Ordnungen an. Das in den DNA-DNA-Homologie-Untersuchungen verwendete Isolat PB 4898-1 (siehe Anhang IV) stand für PCR-Analysen leider nicht mehr zur Verfügung. Vergleiche zwischen den hier erhobenen Daten weiterer 'Einsporkulturen' dieses Isolierungsansatzes und den früheren Untersuchungen sind aber möglich, indem andere in denselben RFLP- bzw. DNA-DNA-Homologie-Gruppen enthaltene Stämme zu Hilfe genommen werden. In Tab.4.1-2 sind daher die molekularen Daten aller Isolate von PB 4898 vergleichend gegenübergestellt. Isolat PB 4898-1, das der DNA-DNA-Homologie-Gruppe E angehört, wird so über den konspezifischen Stamm PB 2857e als genetisch übereinstimmend mit den 'Einsporkulturen' der RFLP-Gruppe VII bzw. denjenigen mit 2.2 kb großen PCR-Produkten charakterisiert. Hingegen finden sich die 'Einsporkulturen' mit 2.6 kb großen PCR-Produkten in einer RFLP-Gruppe mit Stamm PB 3684, der in die DNA-DNA-Homologie-Gruppe x eingeordnet worden war, da er mit der die Gruppe E charakterisierenden Sonde kein positives Signal zeigte.

Bei der Isolierung der 'Einsporkulturen' von PB 4898 wurden nach den Ergebnissen dieser Untersuchung somit mehrfach Kulturen von einer den Entylomatales angehörenden Art erhalten, während parallel dazu aber auch das gewünschte, die typische Gallbildung auslösende *Exobasidium* isoliert wurde. Die *Exobasidium*-Isolate werden über die 26S rDNA-Sequenz der Domäne I der *E. japonicum* - *E. shiraianum*-Gruppe zugeordnet (siehe Abb. 3.2.2-1/-2). Ob es sich bei der isolierten Entylomatales-Art um einen in der *Exobasidium*-Galle wachsenden Pilz oder um eine oberflächliche Kontamination auf der Galle gehandelt hat, kann im Nachhinein auch mit molekularen Untersuchungen nicht mehr geklärt werden.

**Tab.4.1-2: Gegenüberstellung der molekularen Daten der ‘Einsporkulturen’ von Stamm PB 4898.** Weitere Stämme sind hinzugenommen, welche molekulare Charakteristika der ‘Einsporkulturen’ teilen, mit ihnen kon-spezifisch sind (**fett**). Das nicht bearbeitete Isolat ist *kursiv* abgesetzt. DNA: Zugehörigkeit zu einer DNA-DNA-Homologie-Gruppe, GC: GC-Wert, PCR: Größe des 5’-Bereichs der 26S rDNA, RFLP: Zugehörigkeit zu einer RFLP-Gruppe, 26S: Affinität der Sequenzen der Domäne I der 26S rDNA zu Entylomatales (= Enty) oder *Exobasidium* (= Exo).  
 . = keine Daten.

Stamm	DNA	GC	PCR	RFLP	26S	
<b>PB 2857e</b>	E	55,5%	2.2 kb	VII	Enty	<b>Vertreter der Entylomatales</b>
<i>PB 4898-1</i>	E	55,9%	.	.	.	
PB 4898-3	.	.	2.2 kb	.	.	
PB 4898-7	.	.	2.2 kb	VII	.	
PB 4898-9	.	.	2.2 kb	.	Enty	
PB 4898-16	.	.	2.2 kb	.	.	
PB 4898-19	.	.	2.2 kb	VII	.	
PB 4898-17	.	.	2.6 kb	XIII	.	<b><i>Exobasidium</i>-Art: <i>E. japonicum</i> - <i>E. shiraianum</i>-Gruppe</b>
PB 4898-18	.	.	2.6 kb	.	Exo	
<b>PB 3684</b>	x	40,3%	2.6 kb	XIII	Exo	

### Anamorphe vom *Tilletiopsis*-Typ als Kontaminationen in *Exobasidium*-Kulturen und ihre phylogenetische Stellung

Im Zusammenhang mit dem Auftreten von Kontaminationen bei der Isolation von *Exobasidium*-Kulturen wird in der Literatur häufig die Gattung *Tilletiopsis* diskutiert. Diese Gattung umfaßt sechs Hyphomycetenarten, die durch die Bildung von Ballistokonidien (d.h. von aktiv abgeschleuderten Konidien) ausgezeichnet sind und von denen die meisten darüber hinaus Blastokonidien (durch Sprossung erzeugte Konidien) bilden und so hefeartig wachsen können (BOEKHOUT 1991, 1998). In neueren Arbeiten werden z.T. acht Arten unterschieden, wenn *Tilletiopsis cremea* Tubaki und *T. lilacina* Tubaki wieder als eigenständige Arten aufgefaßt und nicht mehr als synonym zu *T. washingtonensis* betrachtet werden (BEGEROW *et al.* 2000, HAMAMOTO *et al.* 2000).

Schon SUNDSTRÖM (1964) verglich physiologische und serologische Eigenschaften von drei nicht näher bestimmten *Tilletiopsis*-Isolaten mit *Exobasidium*-Isolaten, da er in seinen Kultivierungsansätzen für Exobasidien manchmal auch *Tilletiopsis*-Sporen fand. Er stellte bei morphologischen Ähnlichkeiten aber durchaus physiologische und serologische Unterschiede fest. So konnten die *Tilletiopsis*-Kulturen Stärke als Kohlenhydratquelle verwenden, was keine der von ihm untersuchten *Exobasidium*-Kulturen vermochte. Diese Eigenschaft wurde später auch von LAASER (1989) als ein Merkmal zur Differenzierung zwischen

Kulturen beider Gattungen verwendet. In seiner Arbeit über Basidiomycetenhefen konnten so einige „*Exobasidium*-Isolate“ als Kontaminationen identifiziert werden. Bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit über phylogenetische Analysen als Vertreter der Entylomatales und Ustilaginales charakterisierten Arten erfolgte mit diesem physiologischen Merkmal jedoch keine Differenzierung gegen *Exobasidium*-Isolate, denn die Stämme PB 393, PB 2857e und RBF 726 zeigten in der Untersuchung von LAASER kein oder nur ein extrem schwaches Wachstum beim Stärketest. Sie verhielten sich im allgemeinen wie die übrigen *Exobasidium*-Kulturen. Auch bei der Charakterisierung von Basidiomycetenhefen über chemische Analysen der Zellwände ließen sich diese drei Stämme nicht von *Exobasidium*-Kulturen unterscheiden, obwohl andere Kulturen aufgrund abweichender Zusammensetzungen der Zellwandzucker durchaus als Kontaminationen klassifiziert werden konnten (DÖRFLER 1990). Bei der zusammenfassenden Charakterisierung von Basidiomycetenhefen über biochemische Merkmale sind diese drei Stämme dann auch als typische Vertreter der Gattung *Exobasidium* aufgeführt, obwohl wegen des beobachteten häufigen Auftretens von Kontaminationen bei der Isolierung von Exobasidien besonderes Augenmerk auf die Abgrenzung gegen *Tilletiopsis*-Arten gelegt wurde (PRILLINGER *et al.* 1990b). Mit der hier vorgestellten Charakterisierung über rDNA-Sequenzdaten ist nun jedoch eine zweifelsfreie Abgrenzung dieser Stämme gegen Angehörige der Gattung *Exobasidium* gegeben, was mit den biochemischen Merkmalen nicht möglich war. Diese Merkmale erscheinen damit geeignet bei auftretenden Unterschieden als Differenzierungsmerkmal *Tilletiopsis*-Vertreter als Kontaminationen zu identifizieren, nicht aber um bei Übereinstimmungen eine zweifelsfreie Zuordnung von Kulturen zu der Gattung *Exobasidium* zu erreichen. Dies bestätigen auch Sequenzanalysen der 26S rDNA an dem von *Camellia spec.* isolierten Stamm CBS 247.52, der als *Exobasidium vexans* Masee in Kultur genommen worden war. Bereits SUNDSTRÖM (1964) hatte Zweifel an der Identität dieses Stammes, der serologische Affinitäten zu den von ihm untersuchten, aber nicht näher bestimmten *Tilletiopsis*-Kulturen zeigte. Er konnte ihn aber physiologisch nicht von *Exobasidium*-Isolaten abgrenzen, da dieser Stamm sich wie alle anderen Exobasidien verhielt und u.a. beim Test auf Stärkeabbau negativ war. Auch hier gruppierte erst die phylogenetische Analyse von Sequenzdaten diesen Stamm gemeinsam mit Stämmen von *Tilletiopsis minor*, womit seine Natur als Kontamination offensichtlich wurde (BOEKHOUT *et al.* 1995). Ein direkter Vergleich der GENBANK-Einträge von „*E. vexans*“ und *T. minor* (AJ235288, AJ235286) zeigt, daß CBS 247.52 im Bereich der Domäne I mit *T. minor* CBS 346.33 identisch ist. Vergleiche der Partialsequenzen der Domäne I der 26S rDNA erweisen sich somit als gut geeignet, um mit Hilfe einer phylogenetischen Zuordnung eine gute Differenzierung zwischen kultivierten Hefestadien der pflanzenpathogenen Exobasidien und damit assoziierten anamorphen Pilzen zu erreichen.

Das regelmäßige Auftreten von *Tilletiopsis* spp. in Kultivierungsansätzen für *Exo-*



*basidium*-Arten wird auch von BEGEROW *et al.* (2000) berichtet. Von den in der vorliegenden Arbeit als Kontaminationen identifizierten Stämmen werden die beiden in den RFLP-Gruppen I bzw. VII repräsentierten Arten über Sequenzvergleiche und phylogenetische Analysen in die Ordnung Entylomatales eingruppiert und damit verwandtschaftlich in die Nähe von *Tilletiopsis*-Arten gestellt, obwohl sie in den oben genannten physiologischen und chemotaxonomischen Untersuchungen von den dort untersuchten Stämmen dieser Gattung verschieden waren. Die Arten der Gattung *Tilletiopsis* selbst sind jedoch nach Sequenzanalysen der Domäne I der 26S rDNA polyphyletisch, und sie werden nach umfangreicheren phylogenetischen Analysen heute verschiedenen Verwandtschaftskreisen der Exobasidiomycetidae zugeordnet (BOEKHOUT *et al.* 1995, BEGEROW *et al.* 2000, FELL *et al.* 2000). *Tilletiopsis washingtonensis* - mit den teils synonym hierzu betrachteten Arten *T. cremea* und *T. lilacina* - wird in der Ordnung Entylomatales geführt, *T. flava*, *T. fulvescens* sowie *T. minor* werden dagegen zu den Geogfischeriales gestellt. Die beiden Arten *T. albescens* und *T. pallescens* werden dabei keiner der heute akzeptierten Ordnungen der Exobasidiomycetidae zugeordnet. Sie stehen in den phylogenetischen Analysen isoliert und werden deshalb als eigenständige Entwicklungslinien innerhalb dieser Unterklasse betrachtet. Zusätzlich ist neben den Angehörigen der Hyphomycetengattung *Tilletiopsis* selbst auch für *Melanotaenium endogenum* (Unger) de Bary und für einige *Entyloma* spp. das Auftreten von *Tilletiopsis*-artigen Anamorphen bekannt (BOEKHOUT 1991, BOEKHOUT *et al.* 1992, BOEKHOUT 1998). Während Pilze mit Anamorphen vom *Tilletiopsis*-Typ früher häufig in die Nähe der Gattung *Tilletia* in die Tilletiales gestellt wurden, finden sich die auf dikotylen Pflanzen lebenden *Entyloma*-Arten mit *Tilletiopsis*-Anamorphen heute in der Ordnung Entylomatales, während auf Poaceen und Cyperaceen lebende Arten in verschiedene Gattungen in der Ordnung Geogfischeriales überführt wurden (BAUER *et al.* 1997, BAUER *et al.* 2001a, BEGEROW *et al.* 2002b). *Melanotaenium endogenum* wurde sogar mit der für auf dikotylen Pflanzen lebenden Arten dieser Gattung neu beschriebenen Familie Melanotaeniaceae in die Ordnung Urocystales der Ustilaginomycetidae gestellt und findet sich damit in einer anderen Unterklasse der Ustilaginomyceten (BEGEROW *et al.* 1997). *Tilletiopsis*-artige Anamorphe, d.h. Hyphen bzw. Pseudohyphen bildende asexuelle Vermehrungsstadien mit Ballistokonidienbildung, finden sich somit in drei Ordnungen der Ustilaginomyceten. Jedoch ist keine der bekannten *Tilletiopsis*-Arten in der Ordnung Exobasidiales angesiedelt, und es sind bisher auch keine *Tilletiopsis*-Anamorphe für *Exobasidium*-Arten beschrieben worden, zumal auch für die von BOEKHOUT (1991) provisorisch als *Tilletiopsis*-Anamorphe von *E. vexans* akzeptierten Stämme, wie oben erwähnt, mit Sequenzdaten eine Zuordnung von Stamm CBS 247.52 zu *T. minor* erreicht wurde (BOEKHOUT *et al.* 1995).

Von den beiden in dieser Arbeit als Vertreter der Entylomatales charakterisierten Arten gruppiert in der phylogenetischen Analyse der 26S rDNA-Partialsequenzen im Kon-

text der Ustilaginomyceten nur Stamm PB 393 = RBF 1008 als Vertreter der RFLP-Gruppe I/DNA-DNA-Homologie-Gruppe A direkt mit der dieser Ordnung angehörenden *Tilletiopsis*-Art, *T. washingtonensis*, die in der Analyse durch Stamm CBS 605.83 (Typusstamm von *T. cremea*, AJ235279) vertreten ist. Diese Zuordnung erhält bei den Distanzmatrixverfahren 100% Jackknife-Unterstützung (Abb.3.4-2/-3) und auch in der Parsimony-Analyse (Abb.3.4-1) wird diese Beziehung angezeigt. Nur in der Bayes'schen Analyse (Abb. 3.4-4) wird *T. washingtonensis* (= *T. cremea*) basal von den anderen Angehörigen der Ordnung abgegliedert. Die BLAST-Suche der Sequenz der Stämme der RFLP-Gruppe I (Tab. 3.2.1-1) zeigt 100% Übereinstimmung mit der Sequenz von *T. washingtonensis* Stamm CBS 544.50 (Typusstamm von *T. washingtonensis*, AJ235278). Für die Entylomatales-Art der RFLP-Gruppe I wird aus diesen Daten gefolgert, daß es sich um einen Angehörigen des Artkomplexes um *T. washingtonensis* handelt, mit hoher Affinität zu *T. washingtonensis* s.str. Allerdings kann mit den vorgelegten Sequenzdaten nicht zweifelsfrei geklärt werden, ob die von *Exobasidium*-infizierten Pflanzen isolierten Stämme *T. washingtonensis* selbst angehören oder ob hier u.U. eine weitere *Tilletiopsis*-Art isoliert wurde. Die Übereinstimmung in den Sequenzen der Domäne I der 26S rDNA spricht zwar für Konspezifität, beweist diese aber nicht, da auch bei nicht-konspezifischen Pilzen identische Sequenzen auftreten können (KURTZMAN & BLANZ 1998, KURTZMAN & ROBNETT 1998, FELL *et al.* 2000). Jedoch spricht auch die BLAST-Suche der ITS-Sequenz von Angehörigen dieser RFLP-Gruppe (Tab.3.6-3) für eine Konspezifität der RFLP-Gruppe I mit *T. washingtonensis*, denn es zeigt sich mit der Sequenz von Stamm ATCC 96156 (AF294696) völlige Übereinstimmung. Und auch die ITS-Sequenz von Stamm JCM 7494 (AB025688) ist in nur sieben Basenpositionen verschieden. Dieser gruppiert in der Analyse von HAMAMOTO *et al.* (2000) mit dem Typusstamm von *T. washingtonensis*, und dessen ITS-Sequenz (AB025686) weist ebenfalls nur acht unterschiedliche Positionen zu derjenigen der RFLP-Gruppe I auf.

Die zweite in dieser Arbeit als Vertreter der Entylomatales charakterisierte Art, die RFLP-Gruppe VII/DNA-DNA-Homologie-Gruppe E, ist in der phylogenetischen Analyse der 26S rDNA-Partialsequenz im Kontext der Ustilaginomyceten durch Stamm PB 2857e repräsentiert. Dieser gruppiert jedoch nicht mit *T. washingtonensis*, sondern immer mit den drei verrechneten *Entyloma*-Arten. Diese Beziehung erhält eine zweifelsfreie statistische Absicherung mit 100% Werten bei allen vier angewandten Analyseverfahren (Abb.3.4-1 bis -4). Auch die BLAST-Suche zeigt für die selbst an zwei Basenpositionen unterschiedlichen 26S rDNA Partialsequenzen der Repräsentanten der RFLP-Gruppe VII jeweils die größte Ähnlichkeit mit nur zwei bzw. vier Basenpaaren Unterschied zu den *Entyloma*-Arten *E. holwayi* und *E. ficariae* (Tab.3.2.1-1). Dies Bild bestätigt zusätzlich die BLAST-Suche der ITS-Sequenz von Stamm PB 2857e (Tab.3.6-3), wo als nächst ähnlich ein von Bambus (*Chimonobambusa marmorea* (Mitford) Makino) stammender, nicht näher identifizierter

Pilz gefunden wird, gefolgt von *Entyloma linariae* mit 47 bp Unterschied und diversen anderen *Entyloma*-Arten. Aus diesen Vergleichen ihrer 26S rDNA- und ITS-Sequenzdaten ergibt sich, daß die hefeartig wachsenden Stämme der RFLP-Gruppe I nicht nur als Vertreter der Entylomatales anzusprechen sind, sondern wohl als Angehörige der Gattung *Entyloma* selbst zu betrachten sind. Obwohl sowohl in den Entylomatales als auch in den Georgefischeriales entsprechende Teleomorph-Anamorph-Beziehungen bekannt sind (BOEKHOUT 1991, BOEKHOUT *et al.* 1992), war es bisher in keiner der beiden Ordnungen möglich mit Sequenzvergleichen und phylogenetischen Analysen eine direkte Beziehung zwischen Arten teleomorpher Gattungen und *Tilletiopsis*-artigen Anamorphen bzw. Vertretern der Hyphomycetengattung *Tilletiopsis* zu belegen (BAUER *et al.* 2001a, BEGEROW *et al.* 2002b). Damit erfolgt hier erstmals aufgrund von Sequenzdaten die Einordnung eines hefeartig wachsenden Anamorphs in die teleomorphe Gattung *Entyloma*. Die Klärung der Frage, ob es sich hier um eine rein anamorphe *Entyloma*-Art handeln könnte oder aber um die saprotrophe Phase im Lebenszyklus einer bzw. welcher *Entyloma*-Art, bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

Die Stämme PB 383, PB 3276 (RFLP-Gruppe I) und PB 2857e (RFLP-Gruppe VII) wurden von BLANZ (1977, 1978) morphologisch-anatomisch untersucht, und in Submerskulturen wurde die Konidienbildung an „septierten Organen“ dokumentiert. Die Bildung der für *Tilletiopsis*-Anamorphe typischen Ballistokonidien wurde jedoch nicht beobachtet. In weiteren Arbeiten wurde das Fehlen von Ballistokonidien für PB 2857e bestätigt und auch für PB 393, den dritten Stamm der RFLP-Gruppe I, wurden keine solchen beobachtet (LAASER 1989, PRILLINGER *et al.* 1990b). Die Zeichnungen bei BLANZ (Fig.1b-d in 1977, 1978) haben ansonsten jedoch durchaus Ähnlichkeiten zu den später bei BOEKHOUT (1991, 1998) gezeigten Illustrationen von *Tilletiopsis*-Arten. Der fehlende Nachweis von Ballistokonidien widerspricht einer Zuordnung zu diesem Verwandtschaftskreis auch nicht, denn es gilt nicht nur die Differenzierung zwischen Ballisto- und Blastokonidien als schwierig, sondern gerade auch für *T. washingtonensis*, mit dem die RFLP-Gruppe I konspezifisch zu sein scheint, ist die Fähigkeit zur Bildung eines Hefestadiums über Blastokonidien belegt (BOEKHOUT 1991). Und bei den ebenfalls *Tilletiopsis*-Anamorphe einschließenden Georgefischeriales wurde gezeigt, daß asexuelle Vermehrungsstadien in Kultur bei Vertretern einer Ordnung durchaus unterschiedliche Konidienbildungen zeigen können (BAUER *et al.* 2001a). Weitergehende Untersuchungen zum Wuchsverhalten der hier als Entylomatales-Vertreter charakterisierten Stämme unter unterschiedlichen Kulturbedingungen könnten interessante Aspekte zur Konidienbildung in diesem Verwandtschaftskreis erbringen.

*Tilletiopsis*-Arten werden zwar meist auf Pflanzenblättern nachgewiesen, sie sind aber auch von unterschiedlichsten Substraten bekannt (BOEKHOUT 1991, BOEKHOUT *et al.* 1992 - siehe dort Tab.1 für einen Überblick). Pilzfruchtkörper (von *Hirneola auricula-judae*) sowie mit pathogenen Pilzen (Mehltau, *Taphrina* sp., *Entyloma* sp.) infizierte Pflanzen dienen u.a.

als Quelle für *Tilletiopsis*-Kulturen und das *T. pallescens*-Isolat „Darjeeling“ wurde von mit *E. vexans* infizierten Teeblättern gewonnen. Insbesondere für *T. washingtonensis* ist eine ganze Reihe an Substraten nachgewiesen. Mit der RFLP-Gruppe I sind nun für diese Art auch verschiedene *Exobasidium*-infizierte *Vaccinium*-Arten der Substratliste hinzuzufügen.

Die in dieser Arbeit der Gattung *Entyloma* zugeordneten konspezifischen Stämme der RFLP-Gruppe VII stammen von verschiedenen *Exobasidium*-infizierten *Rhododendron*-Arten unterschiedlicher Herkunft (Süddeutschland, Kanada). Handelt es sich bei diesen Kulturen tatsächlich um die (vermutlich) haploide Phase in dem dimorphen Lebenszyklus einer *Entyloma*-Art, so ist damit ein Lebensraum für eine saprotrophe Vermehrungsform dieser Pflanzenparasiten gefunden. Die haploiden Anamorphe und Hefestadien der Ustilaginomyceten werden zwar häufig im Zusammenhang mit systematischen Fragestellungen diskutiert, ihre ökologische Bedeutung bei der Ausbreitung und Epidemiologie dieser Pilze wird dabei aber selten erwähnt und über ihr Vorkommen als frei-lebende Hefen ist wenig bekannt (BOEKHOUT 1987, BOEKHOUT *et al.* 1998, BAUER *et al.* 2001b). Und so können auch BEGEROW *et al.* (2002b) für die Gattung *Entyloma*, für die sie ein Artkonzept mit hoher Wirtsspezifität favorisieren, nur festhalten, daß die saprotrophe Lebensphase bisher kaum verstanden ist. Das Wirtsspektrum der Gattung erstreckt sich über unterschiedliche Gruppen dikotyle Pflanzen, umfaßt aber nicht die Familie der Ericaceae (BEGEROW *et al.* 2002b Fig.1). Die hier aufgezeigte Verbindung zwischen Hefen von Rhododendren und der Gattung *Entyloma* liefert einen deutlichen Hinweis darauf, daß eine Vermehrung, Überdauerung und wohl auch Weiterverbreitung dieser Organismen auch auf anderen Substraten bzw. zumindest auf anderen Pflanzen möglich ist als denen, die sie als Pathogene infizieren. Auch bei dem in der BLAST-Suche der ITS-Sequenzen mit hoher Sequenzähnlichkeit gefundenen Pilz, dessen ITS-Sequenz gemeinsam mit verschiedenen anderen pilzlichen Sequenzen in PCR-Amplifikaten von Bambuspflanzen enthalten war (ZHANG *et al.* 1997), könnte es sich um ein entsprechendes, saprotroph auf Blättern lebendes Anamorph handeln und nicht wie die Autoren vermuten um „pathogens at a preinfection stage“.

Das Hervorrufen typischer *Exobasidium*-Gallen durch Pilze aus dem Verwandtschaftskreis der Entylomatales ist bisher nicht bekannt. Man kann wohl davon ausgehen, daß bei den Pflanzen, von denen pilzliche Isolate hier als Angehörige der Entylomatales charakterisiert wurden, die typischen Krankheitssymptome immer durch Befall mit Exobasidien ausgelöst waren. Wie oben schon ausgeführt, wurden beim Anlegen der ‘Einsporkulturen’ von PB 4898 neben den Isolaten der Entylomatales-Kontamination auch die entsprechenden *Exobasidium*-Isolate erhalten (siehe Tab.4.1-2). Bei den übrigen gerade diskutierten Stämmen sind allerdings nur einzelne Isolate in Kultur genommen worden, womit ein solch direkter Nachweis nicht möglich ist. Es bleibt daher nur anzumerken, daß in den meisten Fällen am selben Standort unabhängig, wenn auch z.T. in deutlichem zeitlichen Abstand, jeweils auch

ein *Exobasidium*-Isolat kultiviert wurde. PB 2857e wurde von Rhododendren in Tübingen isoliert; sechs Jahre später wurde mit PB 5634 ein Stamm der „*E. rhododendri* b“-Gruppe von denselben Pflanzen in Kultur genommen. PB 383 wurde 1973 von *V. uliginosum* im Haspelmoor gewonnen; im selben Gebiet wurde drei Jahre später mit PB 4153 ein *E. pachysporum*-Stamm isoliert. Und PB 393 = RBF 1008 wurde 1973 von *V. vitis-idaea* im Dürnbucher Forst isoliert; am selben Standort wurde ein Jahr später mit PB 1834 ein Stamm der *E. vaccinii*-Gruppe in Kultur genommen. Damit ist zumindest für diese drei Stämme das Auftreten von entsprechenden, lokal infizierenden Exobasidien an den jeweiligen Standorten belegt. Schon WORONIN (1867) wies auf die Notwendigkeit von Neuinfektionen zur Gallbildung bei *V. vitis-idaea* hin, und für die auffälligen Gallen von *Rh. indicum* wurde dies durch experimentelle Arbeiten eindeutig belegt (GÖTTGENS 1959, GRAAFLAND 1960). In seiner Zusammenfassung der von Exobasidien ausgelösten Erkrankungsbilder kommt NANNFELDT (1981) dann auch zu dem Schluß, daß alle lokalen Infektionen („circumscribed“ und „surculicolous“, siehe Kapitel 1.2) jährlich bzw. jeweils an austreibenden Pflanzenteilen erneuert werden müssen. Da eine Möglichkeit der Überdauerung der Pilze in frisch infizierten jungen Blättern bzw. Knospen zu bestehen scheint, kann die, wenn auch zeitlich versetzte Isolierung von Exobasidien in den genannten Fällen zumindest als Hinweis auf die für die früheren Erkrankungen verantwortlichen Exobasidien gewertet werden.

### **Stamm RBG 726 - ein Vertreter der Ustilaginales als Kontamination?**

Verwandschaftliche Beziehungen der in dieser Arbeit als Nicht-Exobasidien identifizierten Stämme zu *Tilletiopsis*-Arten der Georgefischeriales, mit denen der oben schon erwähnte Stamm „*E. vexans*“ CBS 247.52 gruppiert (BOEKHOUT *et al.* 1995), konnten hier nicht gefunden werden. Neben den Angehörigen der Entylomatales wird hier aber mit RBF 726 ein Isolat von *V. vitis-idaea* als Mitglied der Ustilaginales identifiziert, das im Gegensatz zu den eben besprochenen Kontaminationen damit zur Verwandtschaft der graminicolen Brandpilze gehört. In der phylogenetischen Analyse der 26S rDNA-Partialsequenzen im Kontext der Ustilaginomyceten wird Stamm RBF 726 mit einer statistischen Absicherung von 100% bei allen angewandten Analyseverfahren gemeinsam mit den drei verrechneten Arten der Ustilaginales gruppiert (siehe Abb.3.4-1 bis -4). *Sporisorium sorghi* und *Pseudozyma antarctica* formen immer eine monophyletische Gruppe, während die genaue Position von RBF 726 nicht aufgelöst wird. Dieser Stamm gruppiert entweder mit *Ustilago maydis* oder er steht basal zu den drei Ustilaginales-Arten, wobei *Doassansiopsis deformans* als Vertreter der Urocystales das Schwestertaxon zu diesen Ustilaginales-Arten bildet.

Die zuvor besprochenen Kontaminationen durch Angehörige der Entylomatales bzw. auch Georgefischeriales entsprechen in ihrer phylogenetischen Position den in der Literatur häufig erwähnten Kontaminationen mit *Tilletiopsis*-Arten. Bei Isolierungsansätzen von Exo-

basidien sind Kontaminationen, welche aus dem Umfeld der Ustilaginales stammen, jedoch kaum bekannt. Ein Hinweis auf solche findet sich bei LAASER (1989), der wegen Übereinstimmungen in physiologischen Merkmalen zwei „*Exobasidium*“-Isolate den Ustilaginales zuordnete - nicht jedoch Stamm RBF 726. Dieser war u.a. mit den Merkmalen „Stärkeabbau“ und „Zusammensetzung der Zellwandzucker“, wie oben schon erläutert, nicht von *Exobasidium*-Kulturen zu unterscheiden (LAASER 1989, DÖRFLER 1990, PRILLINGER *et al.* 1990b - als „Pr 1986/58/2“). Damit zeigt sich, daß diese Merkmale selbst bei relativ großen phylogenetischen Distanzen zwischen Angehörigen zweier Unterklassen der Ustilaginomyceten nicht zwingend differenzieren.

Wenn auch keine Vertreter der polyphyletischen Gattung *Tilletiopsis* in den Ustilaginales angesiedelt sind, so ist doch das Vorkommen eines *Tilletiopsis*-artigen Anamorphs bei *Melanotaenium endogenum* bekannt (BOEKHOUT 1991). Diese Art bzw. die Familie der Melanotaeniaceae wurde inzwischen zu den Urocystales gestellt (BAUER *et al.* 1997, BEGEROW *et al.* 1997). Diese durch ultrastrukturelle Synapomorphien gestützte Zuordnung findet sich auch bei BAUER *et al.* (2001b), wenn auch molekulare Stammbäume (BEGEROW *et al.* 2000, FELL *et al.* 2000) diese Gruppe, allerdings ohne statistische Absicherung, basal zu den Ustilaginales zeigen. Könnte es sich bei Stamm RBF 726 somit um das *Tilletiopsis*-artige Anamorph einer *Melanotaenium*-Art handeln und dieser damit trotz seiner phylogenetischen Stellung in den Ustilaginomycetidae auch zu den in der Literatur häufiger beschriebenen *Tilletiopsis*-artigen Kontaminationen zählen? Bei RBF 727 wurden zwar ebensowenig wie bei den beiden hier als Entylomatales-Kontaminationen gezeigten Fällen Ballistokonidien gefunden (LAASER 1989, PRILLINGER *et al.* 1990b), was aber eine Zugehörigkeit zu an sich *Tilletiopsis*-Anamorphe bildenden Gruppen bzw. Arten, wie oben schon diskutiert, nicht ausschließen muß. Doch zeigen hier die GENBANK-Vergleiche sowohl der 26S rDNA- also auch ITS-Sequenz auffällende Ähnlichkeiten zu Vertretern der Anamorph-Gattung *Pseudozyma* Bandoni und der Brandpilzgattung *Ustilago*, nicht aber zu *Melanotaenium*-Arten. Es ist für Stamm RBF 726 keine engere verwandtschaftliche Beziehung zu *Tilletiopsis*-artige Anamorphe bildenden Pilzen festzustellen.

Neben diesem *Tilletiopsis*-artigen Anamorph bei *Melanotaenium* gibt es innerhalb der Ustilaginomycetidae eine Reihe hefeartig sprossender Anamorphe mit reiner Blastokonidienbildung in den Ustilaginales, die der Gattung *Pseudozyma* angehören. Schon 1987 (BOEKHOUT) wurde aufgrund morphologisch-anatomischer Vergleiche und physiologischer Eigenschaften eine enge verwandtschaftliche Beziehung verschiedener Hefen zu den Brandpilzen vorgeschlagen. Mit Partialsequenzen der 26S rDNA konnte diese später belegt werden (BOEKHOUT *et al.* 1995, FELL *et al.* 1995) und die entsprechenden Arten der Gattungen *Candida* Berkhout, *Sporobolomyces* Kluyver & C.B.Niel, *Stephanoascus* M.T.Sm., van der Walt & Johannsen, *Sterigmatomyces* und *Trichosporon* Behrend wurden demgemäß in einer

Anamorph-Gattung, nämlich in der Gattung *Pseudozyma*, vereint (BOEKHOUT 1995, BOEKHOUT & FELL 1998). Diese umfaßte somit sieben Arten, welche Hyphen bzw. Pseudohyphen formen, mit Blastokonidien sprossend hefeartig wachsen und von so unterschiedlichen Substraten wie Seesedimenten der Antarktis, frischen Reiskörnern oder Pflanzen - auch mit Mehltau oder Schimmelpilzen infizierten - bekannt sind. Jüngst sind zusätzlich zwei neue Arten beschrieben worden, die aus menschlichem Blut isoliert wurden (SUGITA *et al.* 2003). Die phylogenetische Analyse der Domäne I der 26S rDNA im Vergleich mit verschiedenen teleomorphen Ustilaginales-Vertretern zeigt jedoch, daß *Pseudozyma*-Arten nicht monophyletisch sind (BEGEROW *et al.* 2000). Sie gruppieren mit unterschiedlichen Brandpilzen und bei den verglichenen Stämmen wurde auch ein *Ustilago-Pseudozyma*-Paar mit identischen 26S rDNA-Partialsequenzen gefunden.

Die BLAST-Suche der 26S rDNA-Partialsequenz (siehe Tab.3.2.1-1) zeigt völlige Übereinstimmung der Sequenz von RBF 726 zu einer Sequenz von *U. maydis* (Stamm MS 115), welche acht Basenpaare Unterschied (davon sieben Indels) zu der hier in der phylogenetischen Analyse verrechneten Sequenz von Stamm RH 521 aufweist. Diese Unterschiede dürften dafür verantwortlich sein, daß RBF 726 nicht in allen Dendrogrammen mit *U. maydis* zusammengruppiert wird. Die BLAST-Suche der ITS-Sequenz (siehe Tab.3.6-3) hingegen zeigt als nächst ähnlich zu RBF 726 zweimal die Sequenz eines Stammes von *Pseudozyma prolifica* (CBS 319.87 = JCM 10319). Diese beiden GENBANK-Einträge sind in ihren Sequenzen an sich identisch, sie weisen aber unterschiedliche Längen auf, weshalb drei zu RBF 726 unterschiedliche Basenpositionen nur in dem längeren Sequenzeintrag feststellbar sind. Auch in der BLAST-Suche der 26S rDNA-Partialsequenz findet sich eine Sequenz von *P. prolifica* CBS 319.87 (AJ235298) direkt nach *U. maydis*-Einträgen („Score“ 813 statt 821). Sie weist nur ein Basenpaar Unterschied zu den übereinstimmenden Sequenzen von RBF 726 und *U. maydis* MS 115 auf. Umgekehrt folgt auch bei den ITS-Vergleichen auf die *P. prolifica*-Einträge eine Sequenz von *U. maydis* (keine Stammangabe in GENBANK) mit nur sieben unterschiedlichen Basenpositionen. Stamm RBF 726 ist innerhalb der Ustilaginales offensichtlich in der Nähe des Maisbrandpilzes und der damit nächst verwandten Hefe *P. prolifica* anzusiedeln, welche in den phylogenetischen Analysen von 26S rDNA-Partialsequenzen bei BEGEROW *et al.* (2000) und SUGITA *et al.* (2003) als Schwestertaxa mit nur geringfügigen genetischen Distanzen zusammengruppiert werden.

Die Basidiosporen vieler ustilaginaler Brandpilze können zu hefeartig wachsenden Kolonien auskeimen, von denen kompatible Zellen später miteinander verschmelzen müssen bevor sie neue Wirtspflanzen als filamentöses Dikaryon infizieren können. Dies ist ein gerade beim Maisbrandpilz gut belegter Mechanismus (CHRISTENSEN 1963, SNETSELAAR & MIMS 1992, SPELLIG *et al.* 1994). Die manchmal auch mit dem Begriff Anamorph bezeichnete Haplophase im Lebenszyklus solcher dimorphen Brandpilze spielt sicherlich als asexuelles,

saprotrophes Vermehrungs- und Ausbreitungsstadium in ihrer Epidemiologie eine bedeutende Rolle, über die aber wenig bekannt ist (OBERWINKLER 1987, BOEKHOUT *et al.* 1998, BAUER *et al.* 2001b). In diesem Zusammenhang wird daher auch die Frage erwogen, ob es sich bei den Hefearten der Anamorph-Gattung *Pseudozyma* nicht einfach um Hefestadien dimorpher Brandpilze handeln könnte statt um eigenständige, frei-lebende Hefen (BOEKHOUT 1987, FELL *et al.* 2001). Die phylogenetische Analyse der Ustilaginomyceten-Anamorphe von BEGEROW *et al.* (2000) und die hier vorgestellten Sequenzdaten legen eine solche Beziehung nahe. Sowohl Stamm RBF 726 als auch *P. prolifica* CBS 319.87 können nach den analysierten Sequenzdaten aufgrund der hohen Übereinstimmungen konspezifisch mit *U. maydis* und damit Hefestadien dieses Pflanzenparasiten sein. Bei vergleichenden Untersuchungen sowohl an Ascomyceten- als auch Basidiomycetenhefen wurde festgestellt, daß Stämme einer Art maximal zwei bis drei Basenpaare Unterschied in der Domäne I der 26S rDNA aufweisen und die meisten Arten sich so auch differenzieren lassen (KURTZMAN & ROBNETT 1998, FELL *et al.* 2000). Die völlig übereinstimmenden Sequenzen von *U. maydis* MS 511 und Stamm RBF 726 und das nur eine Basenpaar Unterschied zu *P. prolifica* CBS 319.87 werden hier als Hinweis auf Konspezifität gewertet. Zumal da die beiden oben diskutierten Stämme von *U. maydis* mit sieben Indels sogar mehr innerartliche Unterschiede aufzuweisen scheinen. Für die ITS-Region ist, teilweise auch im Vergleich mit DNA-DNA-Hybridisierungsdaten, eine innerartliche Sequenzvariabilität von bis zu 1% festgestellt worden (GARDES *et al.* 1991b, MONCALVO *et al.* 1995b, SUGITA *et al.* 1999). Auch dem entsprechen die hier gefundenen Unterschiede von drei bzw. sieben Basenpaaren von RBF 726 zu *P. prolifica* bzw. *U. maydis*, womit die Zugehörigkeit der Stämme zu einer Art unterstützt wird. Kreuzungs- und eventuell anschließende Infektionsversuche mit definierten *U. maydis*-Hefen wären ebenso wie eine Bestimmung von DNA-DNA-Homologien geeignet, um in weiterführenden Untersuchungen die hier nach Sequenzdaten gefolgerte Konspezifität dieser Stämme abzusichern. Auch wenn für *P. prolifica* und *U. maydis* hier Konspezifität postuliert wird, muß offen bleiben, ob auch die übrigen *Pseudozyma*-Arten Hefestadien der Brandpilze darstellen.

*Pseudozyma* spp. sind von einer Reihe von Substraten bekannt, und wegen ihrer engen Beziehung zu Brandpilzen wurde ein Vorkommen entsprechender Hefen auf Gräsern vorhergesagt (BEGEROW *et al.* 2000). Für *U. maydis* sind mit den beiden hier als konspezifisch betrachteten Hefen alternative Substrate für die saprotrophe Lebensphase nachgewiesen: *P. prolifica* CBS 319.87 stammt von verrottendem *Scirpus microcarpus* J.Presl & C.Presl (BANDONI 1985) und RBF 726 von *Exobasidium*-infiziertem *Vaccinium vitis-idaea*. Auch für einige Hefeisolate aus Fruchtkörpern von Hymenomyceten wurde schon gezeigt, daß sie Hefestadien von *U. maydis* darstellen, wenn eine Kontamination der Isolierungsansätze mit ubiquitär verbreiteten Brandpilzsporen auch nicht ganz ausgeschlossen wurde (LAASER 1989). Auch bei Stamm RBF 726 kann das Auskeimen von Brandpilzsporen auf der



Agarplatte des Isolierungsansatzes nicht völlig ausgeschlossen werden. Gerade aber auch im Zusammenhang mit den klinischen Isolaten anderer *Pseudozyma*-Arten (SUGITA *et al.* 2003) sind zukünftige Studien zur Verbreitung und Ökologie der ustilaginalen Hefen daher sehr wünschenswert, deren Nachweis mit den inzwischen vorliegenden Sequenzinformationen über spezifische PCR-Amplifikationen auch ohne aufwendige Isolationen möglich sein sollte.

Da *Ustilago* spp. jedoch an Ericaceen keine typischen exobasidialen Krankheitsbilder hervorrufen, muß auch bei RBF 726 davon ausgegangen werden, daß hierfür ein *Exobasidium*-Befall ursächlich war; mit Stamm RBF 727 wurde auch in diesem Fall ein Mitglied der *E. vaccinii*-Gruppe am selben Tag im selben Gebiet isoliert.

Die hier mit umfangreichen phylogenetischen Analysen aufgezeigte Zuordnung von Stämmen, die als Exobasidien isoliert worden waren, zu anderen Pilzgruppen und ihre damit erfolgte Charakterisierung als Kontaminationen zeigt wie wichtig die Verfügbarkeit von Material für Referenzuntersuchungen ist (zu dieser Problematik siehe auch AGERER *et al.* 2000, CROUS 2002). Stamm PB 393, ein Vertreter der Entylomatales, wurde in früheren Arbeiten, wie oben schon diskutiert, häufig als ein typischer Vertreter der Gattung *Exobasidium* betrachtet. Auch in ersten phylogenetisch ausgerichteten Arbeiten (UNSELD 1988, BLANZ *et al.* 1989), in denen ansonsten nur *Microstroma juglandis* und *Ustilago hordei* als Vertreter der Ustilaginomycetes enthalten waren, entsprachen die Ergebnisse durchaus den Erwartungen und war eine Interpretation als Kontamination nicht möglich. Erst die heute durchführbaren Untersuchungen mit umfangreicheren Vergleichsdatensätzen ermöglichen dies. Zwar sind auch Artefakte bei der Stammhaltung nie gänzlich auszuschließen, jedoch legt die große Übereinstimmung bei den molekularen Daten, wie sie sich in der Gruppierung der Stämme der RFLP-Gruppen I und VII bei den früheren DNA-DNA-Homologie- und GC-Wert-Untersuchungen und den hier Jahre später durchgeführten PCR-RFLP- und Sequenzanalysen widerspiegelt, den Schluß nahe, daß es sich nicht um Artefakte der Kulturhaltung handelt. Darüber hinaus erwiesen sich hier auch die etwa 20 Jahre in getrennten Stammsammlungen gehaltene Kulturen eines dieser Stämme (PB 393 = RBF 1008) immer noch als identisch.

## **4.2 Introns in der 26S rDNA der Gattung *Exobasidium***

In den Amplifikaten des 5'-Bereichs der 26S rDNA der hier untersuchten Stämme sind Überlängen bis zu ca. 700 bp im Vergleich zu den kodierenden Sequenzen von *Saccharomyces cerevisiae* vorhanden (siehe Tab.3.1.2-1). Zwar galten die nukleären ribosomalen Gene lange als intron-frei, jedoch sind mittlerweile bei vielen Organismen in ihnen Introns gefunden worden. Bei Pilzen wurden in der 18S rDNA erstmals 1989 (SOGIN & EDMAN) und

in der 26S rDNA 1992 (LIU *et al.*) Group-I-Introns nachgewiesen. Die weitere Analyse der gefundenen Insertionen an den Positionen 929/930 und 1.127/1.128 in der 26S rDNA von *Exobasidien* im Rahmen der Diplomarbeit von E. STEVANECZ (1998) hat die Sequenzmotive der „Splicing Sites“ und die typischen Sekundärstrukturelemente von Group-I-Introns (BURKE *et al.* 1987, CECH 1988) für diese Insertionen bestätigt. Hinweise auf die in pilzlichen rDNAs ebenfalls nachgewiesenen und in jüngerer Zeit vermehrt diskutierten spliceosomalen Introns (ROGERS *et al.* 1993, BHATTACHARYA *et al.* 2000, CUBERO *et al.* 2000) sind nicht festzustellen.

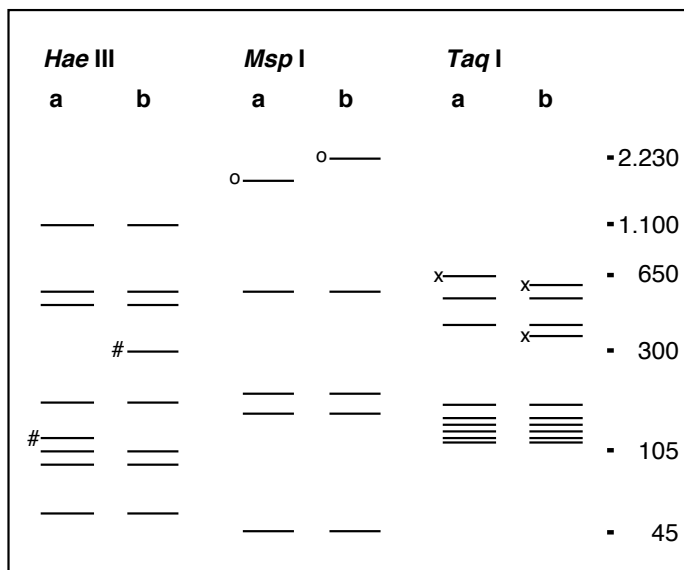
Es treten fünf unterschiedliche 26S rDNA-Typen im Hinblick auf Art und Verteilung dieser Introns auf, die mit den PCR-Produktgrößenklassen korrelieren (siehe Abb.3.3-1 und Tab.3.3-1). An den beiden Insertionsorten treten dabei zwei voneinander verschiedene Group-I-Introns auf und an Position 929/930 sind zusätzlich zwei durch ihre Länge unterschiedene Introns festzustellen. Die diskrete Insertion in dem längeren dieser beiden Introns (Typ a2) könnte dabei auf das Auftreten eines proteinkodierenden „Open Reading Frames“ hindeuten, welches für einige Group-I-Introns beschrieben ist (DUJON 1989, LAMBOWITZ & BELFORT 1993). Alle fünf 26S rDNA-Typen sind bei Vertretern der Gattung *Exobasidium* zu beobachten, denn die im vorhergehenden Kapitel diskutierten Stämme, die nicht der Gattung *Exobasidium* angehören, haben alle intron-freie, 2.2 kb große PCR-Amplifikate.

Neben dem Auftreten von Kontaminationen bietet in einigen anderen Fällen das Auftreten dieser Group-I-Introns in der 26S rDNA eine Erklärung für überraschende Ergebnisse der PCR-RFLP-Analysen. Allerdings erklären die unterschiedlichen 26S rDNA-Typen nicht alle noch verbleibenden unerwarteten PCR-RFLP-Ergebnisse. Die Aufteilung in verschiedene RFLP-Gruppen kann, wie im folgenden ausgeführt wird, bei den ‘Einsporkulturen’ von PB 4864 und der DNA-DNA-Homologie-Gruppe F auf das Auftreten von Group-I-Introns zurückgeführt werden. Bei der DNA-DNA-Homologie-Gruppe B beruht sie jedoch darüber hinaus auf Unterschieden, die sich auch in den kodierenden rDNA-Bereichen widerspiegeln.

### **Die ‘Einsporkulturen’ von PB 4864 gehören einer Art an - trotz unterschiedlicher PCR-Produktgröße zeigen die RFLP-Muster hohe Übereinstimmung**

Die ‘Einsporkulturen’ von Stamm PB 4864 verteilen sich in den PCR-RFLP-Analysen ebenso wie die ‘Einsporkulturen’ von PB 4898 auf zwei Gruppen: Die RFLP-Gruppe XVII (PB 4864-3, -4) in der durch ein Intron vom Typ a1 charakterisierten 2.6 kb PCR-Produktgrößenklasse und die RFLP-Gruppe XVIII (PB 4864-2) in der durch zwei Introns vom Typ a1 und Typ b charakterisierten 2.9 kb PCR-Produktgrößenklasse. In diesem Fall zeigen die PCR-RFLP-Muster beider Gruppen jedoch große Übereinstimmungen. Die in der 0/1-Matrix (Tab.3.1.3.3-1) kodierten Fragmentlängenpolymorphismen zwischen beiden RFLP-

Gruppen haben ihre Ursache bei einigen der verwendeten Enzyme in einem einzigen Längenpolymorphismus zwischen zwei homologen Schnittstellen (Abb.4.2-1). Bei den beiden Enzymen *Hae* III und *Msp* I ist die Größenverschiebung eines einzelnen Restriktionsfragmentes zu beobachten während bei *Taq* I ein solcher Längenpolymorphismus mit einer zusätzlichen Restriktionsschnittstelle verbunden ist, so daß hier statt eines größeren zwei kleinere, aber in Summe größere Fragmente auftreten. Die Übereinstimmung in den RFLP-Mustern spiegelt sich auch in der Ähnlichkeitsanalyse wieder, wo beide RFLP-Gruppen gemeinsam gruppieren (siehe Abb.3.1.3.4-1/-2). Die RFLP-Gruppen der 'Einsporkulturen' von PB 4864 unterscheiden sich in ihren Introns, während sie in den kodierenden rDNA-Abschnitten keine größeren, über die PCR-RFLP-Analyse erfaßbaren Unterschiede aufweisen. Das Auftreten unterschiedlicher Introns mag die Ursache dafür sein, daß der Längenpolymorphismus bei den übrigen Enzymen nicht so eindeutig zu beobachten ist. Im Gegensatz zu den ebenfalls auf zwei PCR-Produktgrößenklassen verteilten 'Einsporkulturen' von Stamm PB 4898 mit ihren deutlich verschiedenen RFLP-Mustern, werden die 'Einsporkulturen' von PB 4864 mit sehr ähnlichen RFLP-Mustern hier als Isolate einer einzigen *Exobasidium*-Art angesehen.



**Abb.4.2-1:** Die Restriktionsmuster dreier Enzyme zeigen bei 'Einsporkulturen' von Stamm PB 4864 trotz verschiedener PCR-Produktgrößenklassen hohe Übereinstimmung. Unter **a** sind die Fragmente von PB 4864-3 bzw. -4 (2.6kb) und unter **b** diejenigen von PB 4864-2 (2.9 kb) dargestellt (siehe auch Tab.3.1.3.3-1). Die Größe einiger Fragment (in bp) ist angegeben und Fragmente, die den Längenpolymorphismus der 2.6 und 2.9 kb großen PCR-Produkten widerspiegeln, sind markiert.

Die DNA-DNA-Hybridisierung wurde auch bei Stamm PB 4864 mit einer 'Einsporkultur' durchgeführt (PB 4864-1, siehe Anhang IV), die für PCR-Analysen nicht mehr ver-

füßbar war. Dieses Isolat wurde aufgrund fehlender positiver Signale mit den Sonden der DNA-DNA-Homologie-Gruppen E und F innerhalb der *Rhododendron*-Parasiten in die DNA-DNA-Homologie-Gruppe x eingeordnet, für deren Stämme untereinander aber keine Konspezifität nachgewiesen wurde (siehe dazu Anhang IV). In den hier durchgeführten PCR-RFLP-Analysen zeigt sich jedoch keine nähere Beziehung von PB 4864 von *Menz. ferruginea* zu den übrigen Stämmen der DNA-DNA-Homologie-Gruppe x (RFLP-Gruppen X, XI und XIII, siehe Abb.3.1.3.4-1/-2).

**Die Stämme der DNA-DNA-Homologie-Gruppe F sind trotz unterschiedlicher RFLP-Muster konspezifisch, während parallel vom selben Ausgangsmaterial (von FO 24040) angelegte Isolate heterogen sind**

Bei den Stämmen PB 4163, FO 24040-1, -2 und -3 handelt es sich um *Exobasidium*-Isolate, die unabhängig voneinander von derselben *Rh. ferrugineum*-Pflanze in Kultur genommen wurden. Schon bei den DNA-DNA-Homologien hatten sich Unterschiede gezeigt (siehe Anhang IV). FO 24040-1 und PB 4163 erwiesen sich als konspezifisch mit PB 5634 und PB 4380 (DNA-DNA-Homologie-Gruppe F), während FO 24040-3 in die DNA-DNA-Homologie-Gruppe x eingeordnet wurde. Isolat FO 24040-1 stand für PCR-Analysen nicht mehr zur Verfügung, statt dessen wurde FO 24040-2 in die Untersuchungen einbezogen. In der PCR-RFLP-Analyse verteilen sich die Stämme der DNA-DNA-Homologie-Gruppe F und dieses parallelen Kultivierungsansatzes auf drei RFLP-Gruppen (VIII, IX und X) in den 2.2 und 2.6 kb Größenklassen, die alle innerhalb des „Hauptclusters“ der *Exobasidium* s.str.-Gruppe stehen (siehe Abb.3.1.3.4-1/-2). Alle für diese Stämme erhobenen molekularen Daten sind in Tab.4.2-1 zusammengestellt.

**Tab.4.2-1: Molekulare Daten der parallel von einer Pflanze angelegten Isolate FO 24040-1, -2, -3 und PB 4163.** Weitere Stämme der DNA-DNA-Homologie-Gruppe F sind zum Vergleich hinzugenommen (**fett**). Das nicht bearbeitete Isolat ist *kursiv* abgesetzt. DNA: Zugehörigkeit zu einer DNA-DNA-Homologie-Gruppe, GC: GC-Wert, PCR: Größe des 5'-Bereichs der 26S rDNA, RFLP: Zugehörigkeit zu einer RFLP-Gruppe, 26S: Sequenzanalyse der Domäne I der 26S rDNA (b = „*E. rhododendri* b“-Gruppe), ITS: identische ITS-Sequenzen (+). . = keine Daten.

Stamm	DNA	GC	PCR	RFLP	26S	ITS	
PB 4163	F	.	2.6 kb	VIII	.	.	<b>in <i>Exobasidium</i> s.str.</b>
<i>FO 24040-1</i>	F	.	.	.	.		
FO 24040-2	.	.	2.6 kb	VIII	b	.	
<b>PB 4380</b>	F	47,1%	2.6 kb	VIII	b	+	
<b>PB 5634</b>	F	47,7%	2.2 kb	IX	b	+	
FO 24040-3	x	.	2.2 kb	X	.	.	<b>in <i>Exobasidium</i> s.str.</b>

In der PCR-RFLP-Analyse bestätigt sich die Abgrenzung von Isolat FO 24040-3 (RFLP-Gruppe X) von den anderen Stämmen des Kultivierungsansatzes wie sie mit den DNA-DNA-Hybridisierungen gefunden worden war. Bei diesem nicht mit der DNA-DNA-Homologie-Gruppe F konspezifischen Stamm ist der 5'-Bereich der 26S rDNA ebenso wie bei der RFLP-Gruppe IX intron-frei, so daß die im PCR-RFLP-Muster von drei Restriktionsenzymen erfaßten Unterschiede zwischen den RFLP-Gruppen IX und X (siehe Abb. 3.1.3.2.2-1) in den Sequenzen des kodierenden Bereichs der 26S rDNA begründet liegen müssen. Die genaue Stellung dieses *Exobasidium*-Isolates innerhalb der Gattung kann zwar mit der PCR-RFLP-Analyse nicht geklärt werden, aber mit den heute vorliegenden Daten bleibt als Schlußfolgerung nur, daß hier von einer *Rhododendron*-Pflanze in parallelen Ansätzen - wohl von unterschiedlichen Gallen - zwei nicht-konspezifische „*E. rhododendri*“-Arten isoliert worden sind. Folglich muß diese Pflanze gleichzeitig mit verschiedenen *Exobasidium*-Arten infiziert gewesen sein. Das Phänomen der „Doppelinfection“ einer einzelnen Pflanze mit zwei verschiedenen Exobasidien ist durch das gleichzeitige Auftreten unterschiedlicher Krankheitsbilder an Preiselbeeren bekannt, wo typische, von *E. vaccinii* hervorgerufene Gallen an systemisch erkrankten Pflanzen beobachtet wurden und daraus auch physiologisch unterscheidbare *Exobasidium*-Isolate gewonnen wurden (SUNDSTRÖM 1964). Für die Bildung von Blattgallen an Azaleen ist die Notwendigkeit der Neuinfektion junger Blätter experimentell belegt (GÖTTGENS 1959, GRAAFLAND 1960) und diese kann für die Gallen an *Rh. ferrugineum* wohl auch angenommen werden, womit auch eine gleichzeitige Besiedelung durch genetisch differenzierte *Exobasidium*-Arten gut vorstellbar ist. Auch wenn die DNA-DNA-Homologie-Gruppe E/RFLP-Gruppe VII in dieser Arbeit als Kontamination erkannt und aus *Exobasidium* ausgeschlossen wird (siehe vorhergehendes Kapitel), so bestätigen die rDNA-Daten hier trotzdem die früher mit den DNA-DNA-Hybridisierungen gefundene Heterogenität der Exobasidien auf europäischen Wirten der Gattung *Rhododendron* (BLANZ 1986, BLANZ & DÖRING 1995, siehe Anhang IV).

Im Gegensatz zu der Abtrennung von FO 24040-3 ist die Aufteilung der übrigen Stämme der DNA-DNA-Homologie-Gruppe F auf zwei RFLP-Gruppen ein unerwartetes Ergebnis der PCR-RFLP-Analysen. Diese Gruppen gehören jedoch zwei verschiedenen PCR-Produktgrößenklassen an und die Sequenzanalyse der Domäne I der 26S rDNA gruppiert sie bei nur maximal zwei unterschiedlichen Basen innerhalb dieses kodierenden rDNA-Abschnittes eindeutig gemeinsam in eine Gruppe („*E. rhododendri* b“, siehe Abb.3.2.2-1/-2 und Anhang XIII). Die identischen, keine Differenzierung ergebenden, 506 bp langen ITS-Regionen der Stämme PB 4380 und PB 5634 (siehe Tab.3.6-2), welche auch in ihren GC-Werten übereinstimmen, bestätigen die Zusammengehörigkeit dieser RFLP-Gruppen unterschiedlicher PCR-Produktgrößenklassen. Für die Auftrennung in die RFLP-Gruppen VIII und IX ist offensichtlich das Intron vom Typ a1 in der 26S rDNA der 2.6 kb Größenklasse

verantwortlich (siehe Tab.3.3-1). Die mit *Msp* I erhaltenen Restriktionsfragmente zeigen auch einen dementsprechenden Längenpolymorphismus mit nur einem einzigen in seiner Größe verschobenen Fragment zwischen diesen beiden RFLP-Gruppen (vergleiche Tab.3.1.3.3-1). Die hier erhobenen Daten widersprechen somit einer Konspezifität der Stämme der DNA-DNA-Homologie-Gruppe F trotz unterschiedlicher PCR-Produktgrößen und den damit verbundenen unterschiedlichen PCR-RFLP-Mustern nicht.

### **Stammspezifische Group-I-Introns: Homothallismus oder Heterothallismus?**

Die bei den 'Einsporkulturen' von PB 4864 und den Stämmen der DNA-DNA-Homologie-Gruppe F verzeichneten Unterschiede im Auftreten von Introns zwischen konspezifischen Stämmen belegen das Vorkommen verschiedener rDNA-Typen innerhalb einzelner *Exobasidium*-Arten. Group-I-Introns in der 26S rDNA treten bei Vertretern der Gattung *Exobasidium* nicht artspezifisch auf; ihre Verteilung zeigt eine innerartliche Variabilität. Eine Konspezifität von Stämmen kann daher allein aufgrund von Größenunterschieden der 26S rDNA-Amplifikate bzw. der ausschließlich daraus resultierenden Unterschiede in ihren RFLP-Mustern nicht ausgeschlossen werden. Früh wurden für Introns, v.a. für Group-I- und Group-II-Introns, ihre Eigenschaften als optional im Genom auftretende, nicht in allen Stämmen oder Rassen einer Art vorhandene, mobile genetische Elemente diskutiert (PERLMAN *et al.* 1990, LAMBOWITZ & BELFORT 1993). Bei einem Flechtenpilz, dem Ascomyceten *Cladonia chlorophaea* (Flörke ex Sommerf.) Spreng., konnten für Group-I-Introns in der 18S rDNA schon 1992 (DEPRIEST & BEEN) individuelle Unterschiede in ihrem Auftreten und ihrer Verteilung gezeigt werden. Und gerade bei der 26S rDNA werden so verursachte Variationen in jüngster Zeit für innerartliche Differenzierung und Charakterisierung von Pilzen genutzt, beispielsweise bei dem Pflanzenparasiten *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) Arx & D.L.Olivier (TAN 1997) und den Insektenparasiten *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch (NEUVÉGLISE *et al.* 1997) und *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin (MAVRIDOU *et al.* 2000, PANTOU *et al.* 2003). Die hier nachgewiesenen unterschiedlichen rDNA-Typen könnten auch bei Exobasidien die Möglichkeit eröffnen, über Group-I-Introns der 26S rDNA intraspezifische Differenzierungen und Populationsstrukturen zu klären. Ihr Potential hierfür muß aber in weitergehenden Untersuchungen abgeklärt werden. Für Artidentifizierungen sind entsprechende PCR-RFLP-Analysen bei Größenunterschieden der Amplifikate aber sicherlich kritisch zu betrachten, wenn auch durchführbar (z.B. DLAUCHY *et al.* 1999).

Die Stämme der DNA-DNA-Homologie-Gruppe F haben z.T. eine unterschiedliche Herkunft. Sie sind unabhängig voneinander isoliert worden, wenn auch z.T. von Gallen einer Pflanze: FO 24040-1, -2 und PB 4163 stammen von einer *Rh. ferrugineum*-Pflanze in Graubünden, PB 4380 jedoch von *Rh. ferrugineum* in Tirol und PB 5634 mit dem intron-freien rDNA-Typ von *Rh. x intermedium* aus Baden-Württemberg. Während hier ein individueller

Unterschied im Auftreten von Group-I-Introns festzustellen ist, finden sich bei den 'Einspor-kulturen' von PB 4864 zwei unterschiedliche rDNA-Typen bei Isolaten, die aus ein und der-selben sporulierenden Galle isoliert wurden. Dafür das zwei unabhängige Infektionen (eine „Doppelinfektion“) gemeinsam eine Galle induzieren und in ihr sporulieren scheint es bis-her keine Belege zu geben. Eine alternative Erklärungsmöglichkeit besteht darin, daß meio-tisch entstandene, haploide Basidiosporen (siehe hierzu MIMS *et al.* 1987) unterschiedliche rDNA-Typen enthielten, womit das Dikaryon bezüglich dieses Markers heterogen („hetero-zygot“) gewesen sein müßte. Genetisch diverse Kerne könnten so auf einen Heterothallis-mus dieses Pilzes hindeuten („Outcrossing“), da Homothallismus eher zu einer genetischen Einheitlichkeit führt („Inbreeding“). Eine solche Interpretation steht jedoch in Widerspruch zu bisherigen Erkenntnissen zum Fortpflanzungsmodus der Exobasidien (siehe auch Kapitel 1.2). Für einen Homothallismus spricht insbesondere die Tatsache, daß Infektionsversuche, die zur Ausbildung typischer Krankheitssymptome wie Gall- oder Blattfleckbildung führen, bei verschiedenen *Exobasidium*-Arten ohne einen Kreuzungspartner direkt mit von einer Pflanze gewonnenem Pilzmaterial durchgeführt werden können. Diese können entweder mit direkt von einer Pflanze abgenommen Sporenabstrichen durchgeführt werden (WORONIN 1867, GÖTTGENS 1959) oder mit von sporulierenden Pflanzenstücken gewonnen Hefekulturen (GRAAFLAND 1953) und auch mit Mono(basidio)sporkulturen (GRAAFLAND 1957, SUNDSTRÖM 1964, NICKERSON 1984, NICKERSON & VANDER KLOET 1997). In der Verwandtschaft der Exo-basidien sind jedoch bei den Brandpilzen durchaus unterschiedliche Fortpflanzungstypen be-kannt. Für Arten der Gattung *Anthracoidea* Bref. ist sowohl ein homothallischer als auch ein pseudohomothallischer Fortpflanzungsmodus bekannt (KUKKONEN & RAUDASKOSKI 1964) und in der Gattung *Ustilago* finden sich heterothallische Arten mit verschiedenen Kreuz-ungstypen. So ist *U. maydis* zu einem Modellbeispiel für heterothallische Basidiomyceten mit tetrapolarem Kreuzungstyp geworden, während *U. hordei* nur ein bipolares Kreuzungs-verhalten zeigt (KOTHE 1996). Molekulare Analysen an größeren Zahlen von Sporen bzw. Nachkommen haben bei filamentösen Basidiomyceten, bei denen eine Kreuzung an Myzelien nicht morphologisch erkennbar ist, aussagekräftige Daten zum Fortpflanzungsmodus gelie-fert (u.a. CALVO-BADO *et al.* 2001, KAUSERUD & SCHUMACHER 2001). Um das Fort-pflanzungsverhalten einzelner *Exobasidium*-Arten und die Bedeutung genetischer Variationen wie sie hier mit den Group-I-Introns der 26S rDNA bei Monosporkulturen eines Pilzes ge-funden wurden zu klären, sind entsprechende Untersuchungen notwendig.

**Die Stämme der DNA-DNA-Homologie-Gruppe B sind nicht alle miteinander konspezifisch - sie repräsentieren zwei nächst verwandte *Exobasidium*-Arten!**

Aus der DNA-DNA-Homologie-Gruppe B standen vier Stämme zur Untersuchung zur Ver-fügung. In der PCR-RFLP-Analyse sind auch diese unerwartet in zwei RFLP-Gruppen (II

und III) in der 2.6 kb und der 2.8 kb Größenklasse innerhalb des „Hauptclusters“ von *Exobasidium* s.str. zu finden. Eine Aufgliederung für die wiederum Group-I-Introns verantwortlich sein könnten, denn diese beiden PCR-Produktgrößenklassen enthalten zwei unterschiedliche Introns an derselben Position der 26S rDNA (Typ a1 bzw. a2, siehe Abb.3.3.1). Die RFLP-Muster des 5'-Bereichs der 26S rDNA weisen jedoch deutliche Unterschiede zwischen diesen beiden *Exobasidium*-Gruppen auf, v.a. bei den Enzymen *Ava* II, *Hae* III und *Hinf* I (vergleiche Tab.3.1.3.3-1). Sequenzvergleiche der Domäne I der 26S rDNA zeigen dementsprechend in diesem Fall auch Unterschiede in dem kodierenden rDNA-Abschnitt auf. Stamm PB 1828 bildet hierbei eine Gruppe gemeinsam mit der Referenzsequenz von *E. arescens*, während die Stämme der RFLP-Gruppe II mit der Referenzsequenz von *E. rostrupii* übereinstimmen (siehe Abb.3.2.2-1/-2). Innerhalb beider Gruppen findet sich zwischen zwei Sequenzen höchstens eine unterschiedliche Base, während zwischen den Stämmen von *E. rostrupii* und von *E. arescens* sieben bzw. acht Basenunterschiede festzustellen sind (siehe Abb.3.2.2-2 und Anhang XIII). Die Sequenzunterschiede zwischen beiden Arten liegen damit deutlich über den im allgemeinen innerartlich festgestellten Werten (KURTZMAN & ROBNETT 1998, FELL *et al.* 2000). Zusätzlich wird die Differenzierung dieser beiden Arten durch unterschiedliche ITS-Sequenzen unterstützt (siehe Tab.3.6-2). Die Stämme der DNA-DNA-Homologie-Gruppe B, deren Charakteristika in Tab.4.2-2 vergleichend gegenübergestellt sind, bilden mit Markern aus dem Bereich der ribosomalen DNA keine homogene Gruppe; Sequenzvergleiche charakterisieren sie als Angehörige zweier *Exobasidium*-Arten. Introns sind hier nicht die Hauptursache für unterschiedliche RFLP-Muster, sondern ein Zusatzfaktor zu Unterschieden in den kodierenden rDNA-Bereichen.

**Tab.4.2-2: Gegenüberstellung der Charakteristika der Stämme von *E. arescens* und *E. rostrupii*.** DNA: Zugehörigkeit zu einer DNA-DNA-Homologie-Gruppe, GC: GC-Wert, PCR: Größe des 5'-Bereichs der 26S rDNA, RFLP: Zugehörigkeit zu einer RFLP-Gruppe, 26S: Sequenzübereinstimmung der Domäne I der 26S rDNA mit Referenzsequenzen (*E. arescens* = ares, *E. rostrupii* = ro), Intron: Typ nach Tab.3.3-1, Wirt: *V. macrocarpum* (= ma), *V. oxycoccos* (= ox), *V. myrtillus* (= myrt), ITS: Länge der ITS-Region (in bp). . = keine Daten.

Stamm	DNA	GC	PCR	RFLP	26S	Intron	Wirt	ITS	
PB 3277	B	51,7%	2.8 kb	II	ro	.	ma	.	<i>E. rostrupii</i>
FO 31777	B	51,4%	2.8 kb	II	ro	.	ox	.	
PB 3275	B	50,5%	2.8 kb	II	ro	a2	ox	500	
RBF 746	.	.	2.8 kb	II	ro	a2	ox	.	
PB 1828	B	48,6%	2.6 kb	III	ares	a1	myrt	509	<i>E. arescens</i>

Die unterschiedliche Eingruppierung der Angehörigen der DNA-DNA-Homologie-



Gruppe B mit den PCR-RFLP-Analysen gab Anlaß zu einer kritischen Betrachtung der ursprünglichen DNA-DNA-Hybridisierungsdaten (BLANZ 1986), welche bei BLANZ & DÖRING (1995) ausgeführt ist (siehe auch Anhang IV). Es zeigte sich, daß die DNA-DNA-Homologie-Gruppe B durch positive Signale mit der Sonde von Stamm PB 1828 charakterisiert wurde. Keiner der ihr zugeordneten Stämme zeigte mit irgendeiner anderen Sonde positive Signale, jedoch waren die Signale mit der Sonde von PB 1828 nicht immer gleich stark. Neben starken Signalen („high DNA homology“) wurden teilweise auch etwas schwächere Signale („significant DNA homology“) registriert. Solch ein schwächeres Signal zeigte die Sonde PB 1828 aber zusätzlich auch noch mit Stamm FO 31778. Dieser wurde aufgrund eines starken Signals mit der immer nur eindeutige Signale liefernden Sonde von Stamm PB 4153 allerdings der DNA-DNA-Homologie-Gruppe C zugeordnet, was die PCR-RFLP-Daten bestätigen (RFLP-Gruppe IV, *E. pachysporum*). Die phylogenetische Analyse von Sequenzdaten zeigt nun, daß die Auswertung der DNA-DNA-Hybridisierungssignale mit den eingesetzten Sonden und Referenzorganismen wohl aufgrund der geringen phylogenetischen Distanz zwischen den Schwestertaxa *E. arescens* und *E. rostrupii* (siehe Abb.3.4-1 bis -4) problematisch ist. Die Bewertung eines signifikanten, aber nicht starken Hybridisierungssignals gilt generell als problematisch. So können die Signalstärken der DNA-DNA-Hybridisierungen u.U. davon beeinflußt werden, ob homo- oder heterothallische Arten untersucht werden, und die Relevanz mittlerer Signalstärke ist in unterschiedlichen Gattungen nicht unbedingt gleich (siehe auch KURTZMAN 1985, 1998). Für *Pichia* spp. wurden z.B. Werte von unter 20-25% zwischen Stämmen verschiedener Arten festgestellt (KURTZMAN *et al.* 1980b), während bei *Issatchenkia* spp. zwischen Stämmen mit Werten von 15% eine Kreuzung noch möglich war (KURTZMAN *et al.* 1980a). Allerdings wird auch die Bedeutung und Vergleichbarkeit der Kriterien „Kreuzbarkeit“ und „DNA-DNA-Homologie“ für Artdefinitionen teils kritisch gesehen (VAN DER WALT & JOHANNSEN 1979, KURTZMAN *et al.* 1980a).

Die mit rDNA-Markern gefundene Auftrennung der vier hier untersuchten Stämme der DNA-DNA-Homologie-Gruppe B in zwei Arten korrespondiert mit den Wirtspflanzen entsprechend dem NANNFELDTschen Artkonzept (vergleiche Tab.4.2-2 mit Tab.1.2-1). Die Stämme von *V. myrtilus* einerseits und von *V. oxycoccus* und *V. macrocarpum* andererseits sind nicht konspezifisch. Auch zeigte die der DNA-DNA-Homologie-Gruppe B entsprechende GC-Wert-Gruppe 2 mit 3,7% die höchste Spannbreite des GC-Wertes innerhalb einer der GC-Wert-Gruppen (siehe Anhang III). Nachdem mit PB 1828 als *E. arescens* von den untersuchten Stämmen dieser GC-Wert-Gruppe derjenige mit dem niedrigsten GC-Wert ausgegliedert wurde, zeigen die hier *E. rostrupii* zugeordneten Stämme nur 1,2% Differenz im GC-Wert, was im Rahmen der im allgemeinen für eine Art akzeptierten Abweichung liegt (KURTZMAN 1985, 1998).

Nach den unerwarteten Aspekten der PCR-RFLP-Auswertung, den damit verbun-

denen Sequenzanalysen und der Struktur der 26S rDNA der Exobasidien werden im Anschluß Artkonzept und Evolution der Gattung *Exobasidium* sowie die Phylogenie der Ordnung Exobasidiales diskutiert.

### 4.3 Die Gattung *Exobasidium* - zum Artkonzept

Allein die Stämme des „Hauptclusters“ der Ähnlichkeitsanalyse der RFLP-Muster (siehe Abb.3.1.3.4-1/-2) gruppieren bei Vergleichen der Domäne I der 26S rDNA gemeinsam mit *Exobasidium*-Referenzsequenzen aus GENBANK (siehe Abb.3.2.2-1 bis -3) und die umfassendere phylogenetische Analyse gruppiert sie gemeinsam mit weiteren Vertretern der Ordnung Exobasidiales (siehe Abb.3.4-1 bis -4). Diese Beziehungen sind durch hohe Unterstützungswerte statistisch abgesichert. Nachdem die übrigen, außerhalb von *Exobasidium* s.str. stehenden Stämme als Kontaminationen charakterisiert sind (siehe Kapitel 4.1), handelt es sich nur bei den hier mit 26S rDNA-Sequenzdaten in den Exobasidiales angesiedelten Stämmen um Vertreter der Gattung *Exobasidium*. Die folgenden Überlegungen zum Artkonzept und die anschließenden Betrachtungen zur Phylogenie der Gattung *Exobasidium* berücksichtigen daher nur diese *Exobasidium*-Stämme.

Mit den hier angewandten molekularen Markern finden sich innerhalb des untersuchten Materials keine konspezifischen *Exobasidium*-Stämme und damit keine Arten, welche Wirte aus unterschiedlichen Gattungen parasitieren. Dies bestätigt die Ergebnisse der DNA-DNA-Hybridisierungen (BLANZ 1986, BLANZ & DÖRING 1995, siehe Anhang IV), wo es ebenfalls keinen Hinweis auf konspezifische Stämme von Wirten aus unterschiedlichen Verwandtschaftskreisen gab, wenn man von der DNA-DNA-Homologie-Gruppe x absieht. Allerdings vereinigt diese DNA-DNA-Homologie-Gruppe nur Stämme, für die aufgrund des Fehlens von Hybridisierungssignalen mit den eingesetzten Sonden keine Zuordnung zu konspezifischen Gruppen vorgenommen werden konnte (siehe auch Anhang IV), und welche sich mit den in dieser Arbeit vorgestellten Daten als heterogen erweisen (siehe Abb.3.2.2-1/-2 und auch Kapitel 4.3.2). Im Gegensatz dazu hatten die GC-Wert-Untersuchungen den Hinweis auf ein *Exobasidium* auf Wirtspflanzen aus verschiedenen Gattungen geliefert (BLANZ & OBERWINKLER 1983, siehe Anhang III). Die GC-Wert-Gruppe 2 umfaßt neben Parasiten von verschiedenen *Vaccinium*-Arten auch einen von *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. isolierten Stamm. Bei den aus dieser GC-Wert-Gruppe (die der DNA-DNA-Homologie-Gruppe B entspricht) hier zur Untersuchung zur Verfügung stehenden Stämmen zeigt sich jedoch schon bei den Isolaten von *Vaccinium* spp. mit Hilfe der rDNA-Daten eine Aufgliederung in zwei *Exobasidium*-Arten, womit eine Konspezifität aller Stämme der GC-Wert-Gruppe 2 widerlegt ist (siehe Tab.4.2-2). Leider stand das Isolat von *Arctostaphylos uva-ursi* nicht mehr für Analysen zur Verfügung, auch liegen keine DNA-DNA-Hybridisierungsdaten

für diesen Stamm vor. Jedoch sind bei dem Merkmal „GC-Wert“ Unterschiede aussagekräftiger als Übereinstimmungen, die keinen Nachweis für Konspezifität darstellen (KURTZMAN 1985, JAHNKE 1987, KURTZMAN 1998). So ist es auch nicht überraschend, daß die rDNA-Analysen den Artstatus von *E. pachysporum* (RFLP-Gruppe IV) im Vergleich zu *E. karstenii* (RFLP-Gruppe XIX) zweifelsfrei bestätigen, obgleich Stämme dieser Arten identische GC-Werte aufweisen (GC-Wert-Gruppe 3 bzw. 9). Wenn es auch zukünftigen Sequenzanalysen an neuen Isolaten der beiden von *Arctostaphylos uva-ursi* beschriebenen Arten, *E. uvae-ursi* (Maire) Juel und *E. sydowianum* Nannf., vorbehalten bleibt, deren Abgrenzung gegen *Vaccinium*-Parasiten endgültig abzuklären, so legt die in dieser Arbeit aufgezeigte Heterogenität der GC-Wert-Gruppe 2 gemeinsam mit der gefundenen Spezifität von *Exobasidium*-Arten für kongenerische Wirte die Folgerung nahe, daß auch der früher untersuchte, von der Bärentraube isolierte Stamm mit anderen Markern als dem GC-Wert differenzierbar gewesen wäre. Der übereinstimmende GC-Wert dieses Stammes mit den hier *E. rostrupii* zugeordneten Stämmen läßt einen Vergleich der auf der Bärentraube beschriebenen Exobasidien mit dieser Art sinnvoll erscheinen, um zu sicheren Artabgrenzungen zu gelangen. In früheren Abhandlungen über Exobasidien sind unabhängig davon, ob enger oder weiter gefaßte Artkonzepte vertreten wurden, zumindest einzelne Arten - häufig *E. vaccinii* - als Parasiten nicht-kongenerischer Wirte akzeptiert worden (z.B. JUEL 1912, BURT 1915, SAVILE 1959a). Während RICHARDS (1896) von positiven Ergebnissen bei Infektionsversuchen an Wirten verschiedener Gattungen berichtete, wurde in späteren Experimenten mit anderen Arten keine Infektion über Gattungsgrenzen hinweg erzielt (GRAAFLAND 1960, SUNDSTRÖM 1964). Diese Ergebnisse schlagen sich auch in dem NANNFELDTschen Artkonzept nieder, welches eine hohe Wirtsspezifität für die Arten der Gattung *Exobasidium* beinhaltet (NANNFELDT 1981). Dieser Ansicht wird heute im allgemeinen gefolgt und für *Exobasidium*-Arten nur die Infektion einer bzw. einiger nächst verwandter Wirtsarten angenommen, wobei nicht-kongenerische Wirte in diesen Betrachtungen, wenn auch unausgesprochen, ausgeschlossen werden (NICKERSON & VANDER KLOET 1997, GÓMEZ & KISIMOVA-HOROVITZ 1998, BEGEROW *et al.* 2002a). Diese Ansicht wird mit den vorgelegten rDNA-Daten und der darauf beruhenden Interpretation der GC-Wert- und DNA-DNA-Homologie-Daten gestützt. Da hier als konspezifisch charakterisierte Stämme immer von kongenerischen Wirten stammen, sind die weiteren Ausführungen nach Wirtsgattungen gegliedert. Exobasidien von Wirten aus den Gattungen *Vaccinium* und *Rhododendron* bilden den Schwerpunkt dieser Arbeit und ihnen wird daher später jeweils ein eigenes Kapitel gewidmet.

*E. reticulatum* von *Thea sinensis* (CBS 156.85) ist der einzige hier mir PCR-RFLPs analysierte *Exobasidium*-Stamm, der nicht von einer Wirtspflanze aus der Familie Ericaceae stammt. Er ist durch ein individuelles RFLP-Muster charakterisiert. In den Sequenzvergleichen der Domäne I der 26S rDNA ist er durch relativ große Distanzen von den übrigen

Exobasidien getrennt, was sich in der Länge der terminalen Äste bei beiden Analyseverfahren widerspiegelt (siehe Abb.3.2.2-1/-2). Von *Thea*- bzw. *Camellia*-Arten sind mehrere *Exobasidium* spp. beschrieben worden. Beide Gattungen werden seit langem als synonym betrachtet, wobei *Camellia* der gültige Name auch für den Teestrauch ist (<http://www.bgbm.fu-berlin.de/iapt/nomenclature/code/SaintLouis/0000St.Luistitle.htm> 'INTERNATIONAL CODE OF BOTANICAL NOMENCLATURE (ST. LOUIS CODE), Art.13.5). Auf Teepflanzen sind zwei Exobasidien bekannt, die sich in mikroskopischen Merkmalen und dem Krankheitsbild unterscheiden - neben dem „net blister blight“ *E. reticulatum* noch der „blister blight“ *E. vexans* (MASSEE 1898, ITO & SAWADA 1912). Da der dem GENBANK-Eintrag letzt genannter Art zugrunde liegende Stamm CBS 247.52 eine Kontamination darstellt (siehe Kapitel 4.1) liegen von *E. vexans* keine Daten zum Vergleich vor. Statt dessen ist mit *E. gracile* (Stamm DSM 4441 von *Camellia* spec.) aus GENBANK die Sequenz einer Art in den Vergleich einbezogen, die von *Camellia sasanqua* Thunb. beschrieben wurde, ursprünglich als Varietät des *Camellia japonica* L. infizierenden *E. camelliae* Shirai (SHIRAI 1896). Die umfassende phylogenetische Analyse (siehe Abb.3.4-1 bis -4) bestätigt die im Sequenzvergleich der Exobasidien gefundene Stellung beider Arten als Schwestertaxon, welche immer hohe statistische Unterstützungswerte erhält, die jedoch immer durch vergleichsweise große Distanzen getrennt sind. Im Verhältnis zu den übrigen in dieser Arbeit analysierten Arten ist die Eigenständigkeit von *E. reticulatum* als Art bestätigt, und sie gruppiert eindeutig gemeinsam mit allen anderen *Exobasidium*-Arten innerhalb der Gattung.

Mit *Andromeda polifolia* ist neben den Vaccinien und Rhododendren eine weitere den Ericaceen angehörende Wirtsgattung hier vertreten. In Europa sind auf dieser Art zwei Exobasidien beschrieben, die beide ganze Sprosse der Rosmarinheide infizieren (siehe Tab. 1.2-1). Ein *Exobasidium*-Befall von *And. polifolia* war früh bekannt (z.B. THOMAS 1877) und wurde auch bald als durch eine eigenständige Pilzart ausgelöst betrachtet (KARSTEN 1882), die schließlich unter dem Namen *E. karstenii* gültig beschrieben wurde (SACCARDO & TROTTER 1912). Durch SUNDSTRÖM (1964) wurde ein davon abweichendes *Exobasidium* auf *And. polifolia* bekannt. Diese seltenere, schwerpunktmäßig in Skandinavien auftretende Art wurde später als *E. sundstroemii* beschrieben (NANNFELDT 1981). GC-Wert-Untersuchungen an zwei aus Süddeutschland stammenden Stämmen, die beide als *E. karstenii* angesprochen worden waren, zeigten zwar um fast 10% auseinanderliegende Werte, aber über die Artzugehörigkeit dieser nicht-konspezifischen Stämme konnte keine Aussage getroffen werden (BLANZ & OBERWINKLER 1983, siehe Anhang III). Die hier untersuchten Stämme von *And. polifolia* schließen den Stamm mit dem niedrigeren GC-Wert ein (PB 5635, GC-Wert-Gruppe 9). Sie erweisen sich als einheitlich und bilden die RFLP-Gruppe XIX (siehe Abb. 3.1.3.4-1/-2). Der Vergleich mit *Exobasidium*-Sequenzen aus GENBANK charakterisiert sie, und damit die GC-Wert-Gruppe 9, als Angehörige von *E. karstenii*, da die Sequenz von

RBF 729 mit der entsprechenden Referenzsequenz identisch ist (siehe Abb.3.2.2-1/-2 und Anhang XIII). Bei vier untersuchten Stämmen spiegelt dies Ergebnis sicherlich die weitere Verbreitung und das häufigere Auftreten von *E. karstenii* wieder. Es ist damit hier kein Stamm analysiert worden, welcher dem im GC-Wert abweichenden PB 4350 (GC-Wert-Gruppe 8), der zur Untersuchung nicht mehr zur Verfügung stand, entsprechen könnte. Jedoch ist der GENBANK-Eintrag von *E. sundstroemii* deutlich von den Sequenzen von *E. karstenii* verschieden und in den umfassenderen phylogenetischen Analysen (siehe Abb. 3.4-1 bis -4) gruppieren diese zwei *And. polifolia* parasitierenden Arten auch nicht als Schwesertaxa. Dies kann mit hohen GC-Wert-Unterschieden korrespondieren. Wenn auch in diesem Zusammenhang die in Nordamerika beschriebenen, meist als eigene Arten geführten Exobasidien auf dortigen *Andromeda* spp. erwähnt werden sollten (siehe BURT 1915, DONK 1966), so gibt es keine Hinweise auf eine weitere Art auf *And. polifolia* in Europa, weshalb hier gefolgert wird, daß die GC-Wert-Gruppe 8 *E. sundstroemii* entspricht.

#### 4.3.1 Zu *Exobasidium* spp. auf *Vaccinium*-Wirten

In Europa sind auf den Vertretern der Gattung *Vaccinium* z.Z. 11 *Exobasidium*-Arten anerkannt (NANNFELDT 1981, siehe Tab.1.2-1). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten *Exobasidium*-Stämme von diesen Wirten verteilen sich auf fünf RFLP-Gruppen, die drei PCR-Produktgrößenklassen angehören (siehe Abb.3.1.3.4-1/-2). Diese Stämme weisen alle Introns im 5'-Bereich der 26S rDNA auf. Die Sequenzen der Domäne I der 26S rDNA ausgewählter Stämme dieser Gruppen zeigen hohe Übereinstimmungen mit Referenzsequenzen aus GENBANK (siehe Abb.3.2.2-1/-2). Diese Übereinstimmungen ermöglichen in einigen Fällen eine Zuordnung der hier untersuchten Stämme bzw. Arten zu neueren Isolaten, die gemäß dem NANNFELDTschen Konzept bestimmt wurden.

Charakteristika und molekulare Daten der untersuchten *Exobasidium*-Stämme von *Vaccinium* spp. sind in Tab.4.3.1-1 aufgelistet. Die *Exobasidium*-Stämme von Vaccinien werden mit den PCR-RFLP-Daten gemäß ihren Wirtsarten differenziert. Nur die RFLP-Gruppe II weist Stämme von zwei *Vaccinium*-Arten auf (*V. macrocarpum* und *V. oxycoccus*), die jedoch nächst verwandt sind und z.T. von *Vaccinium* abgetrennt in einer eigenen Gattung *Oxycoccus* geführt werden (siehe z.B. INDEX KEWENSIS, ROYAL BOTANIC GARDENS KEW 1997). In den GC-Wert-Untersuchungen und DNA-DNA-Hybridisierungen traten hingegen früher zwei Gruppen auf, die jeweils Stämme von mehreren unterschiedlichen *Vaccinium* spp. beinhalteten (BLANZ & OBERWINKLER 1983, BLANZ 1986, BLANZ & DÖRING 1995, siehe Anhang III und IV). Für die GC-Wert-Gruppe 1/DNA-DNA-Homologie-Gruppe A wurde hier nachgewiesen, daß es sich um einen Vertreter der Entylomatales handelt (siehe Kapitel 4.1), und für die hier untersuchten Stämme der GC-Wert-Gruppe 2/DNA-DNA-Homologie-

Gruppe B wurde gezeigt, daß sie zwei nächst verwandten *Exobasidium*-Arten angehören und diese Gruppe daher heterogene Stämme umfaßt (siehe Kapitel 4.2 und Tab.4.3.1-1). Die vorliegenden rDNA-Daten sowie die daraus resultierende Bewertung der GC-Wert- und DNA-DNA-Homologie-Daten stimmen mit der in dem NANNFELDTschen Konzept (vergleiche Tab. 1.2-1) dargelegten Wirtsspezifität der *Exobasidium*-Pathogene auf *Vaccinium* spp. überein.

**Tab.4.3.1-1: Überblick über die RFLP-Gruppen mit *Exobasidium*-Stämmen von *Vaccinium* spp.** GC: GC-Wert, DNA: Zugehörigkeit zu einer DNA-DNA-Homologie-Gruppe, 26S: Affinität der Sequenzen der Domäne I der 26S rDNA zu Referenzsequenzen aus GENBANK (- = nicht sequenziert). Zum Befallsbild: <sup>1)</sup> nicht eindeutig - BLANZ & OBERWINKLER (1983 S.204): „type of infection could not definitely be characterized“, <sup>2)</sup> keine Angaben vorliegend, aber ursprünglich als „*E. myrtilli*“ bestimmt (siehe Kapitel 2.1), weshalb der Befall den früheren Artumschreibungen entsprechend systemisch gewesen sein müßte.

RFLP	Stamm	Wirt	Befallsbild	GC	DNA	26S
<b>2.5 kb PCR-Produktgrößenklasse</b>						
<b>V</b>	CBS 183.56	<i>V. vitis-idaea</i>	unbekannt			<i>E. vaccinii</i>
	FO 31761	<i>V. vitis-idaea</i>	systemisch	39,9%	D	-
	PB 394	<i>V. vitis-idaea</i>	systemisch	39,2%		-
	PB 1834	<i>V. vitis-idaea</i>	lokal <sup>1)</sup>	39,1%	D	-
	PB 3385	<i>V. vitis-idaea</i>	systemisch <sup>2)</sup>		D	<i>E. vaccinii</i>
	PB 4143	<i>V. vitis-idaea</i>	systemisch	39,4%	D	<i>E. vaccinii</i>
	RBF 727	<i>V. vitis-idaea</i>	systemisch			<i>E. vaccinii</i>
	RBF 763	<i>V. vitis-idaea</i>	lokal			<i>E. vaccinii</i>
	RBF 765	<i>V. vitis-idaea</i>	lokal			<i>E. vaccinii</i>
<b>2.6 kb PCR-Produktgrößenklasse</b>						
<b>III</b>	PB 1828	<i>V. myrtillus</i>	lokal	48,6%	B	<i>E. arescens</i>
<b>IV</b>	FO 31778	<i>V. uliginosum</i>	lokal	44,4%	C	-
	PB 4153	<i>V. uliginosum</i>	lokal	44,7%	C	<i>E. pachysporum</i>
<b>XV</b>	RBF 737	<i>V. uliginosum</i>	lokal			-
<b>2.8 kb PCR-Produktgrößenklasse</b>						
<b>II</b>	PB 3277	<i>V. macrocarpum</i>	lokal	51,7%	B	<i>E. rostrupii</i>
	FO 31777	<i>V. oxycoccus</i>	lokal	51,4%	B	<i>E. rostrupii</i>
	PB 3275	<i>V. oxycoccus</i>	lokal	50,5%	B	<i>E. rostrupii</i>
	RBF 746	<i>V. oxycoccus</i>	lokal			<i>E. rostrupii</i>

Die ein lokales Befallsbild mit Blattflecken auslösenden Stämme von *V. macrocarpum* und *V. oxycoccus* sind nach dem NANNFELDTschen Artkonzept als *E. rostrupii* anzusprechen. Während dieser lokale Befall der Moosbeeren lange Zeit unter *E. vaccinii* geführt und erst von NANNFELDT (1981) selbst als eigene Art beschrieben wurde, ist für einen verformte Sprosse hervorrufenden Parasiten auf *V. oxycoccus* schon 1885 (ROSTRUP) der Name

*E. oxycocci* eingeführt worden. Dementsprechend wurde Stamm PB 3275, der als *E. vaccinii* in Kultur genommen worden war, dann auch bei PRILLINGER *et al.* (1990b) unter *E. rostrupii* geführt. Der Sequenzvergleich der Domäne I der 26S rDNA zeigt, daß die Stämme der RFLP-Gruppe II mit der *E. rostrupii*-Referenzsequenz aus GENBANK bis auf ein Basenpaar identisch sind (siehe Abb.3.2.2-1/-2 und Anhang XIII). Die Stämme der RFLP-Gruppe II können damit eindeutig *E. rostrupii* zugeordnet werden, zumal ein GENBANK-Eintrag von *E. oxycocci* mit größeren Sequenzunterschiede deutlich getrennt steht (siehe Abb.3.4-1 bis -4). *E. rostrupii* und *E. oxycocci* gehören im NANNFELDTschen Konzept zu den wenigen *Exobasidium*-Arten, die auf mehreren, nah verwandten Wirtsarten vorkommen. Neben *V. oxycoccoidium* und dem z.T. nur als Unterart hiervon geführten *V. microcarpum* wird auch vom Befall der ursprünglich in Nordamerika heimischen großfrüchtigen Moosbeere (*V. macrocarpum*) ausgegangen, wie dies auch schon SHEAR (1907) tat. Die Übereinstimmung aller vorliegenden molekularen Daten von Stamm PB 3277 von diesem Wirt mit den drei übrigen Stämmen von *V. oxycoccoidium* bestätigt diese Annahme. Dasselbe Wirtsspektrum wird für eine weitere, jüngst in Nordamerika beschriebene *Exobasidium*-Art angegeben, die ein von den beiden oben genannten Arten abweichendes Befallsbild auslöst (NICKERSON 1984).

Stamm PB 1828 von *V. myrtilloides*, der die RFLP-Gruppe III bildet und einen lokalen Befall auslöst, wurde ebenfalls als *E. vaccinii* in Kultur genommen. Ähnlich wie bei *E. rostrupii* auf den Moosbeeren wurden auch die begrenzten Blattflecken auf der Heidelbeere lange Zeit als eine Form von *E. vaccinii* betrachtet und wiederum erst durch NANNFELDT (1981) mit *E. arescens* eine eigenständige Art hierfür beschrieben. Stamm PB 1828 ist nach dem NANNFELDTschen Artkonzept als *E. arescens* anzusprechen. Im Bereich der Domäne I der 26S rDNA weist die hier bestimmte Sequenz zu dem GENBANK-Eintrag von *E. arescens* auch nur eine Basenposition Unterschied auf (siehe Abb.3.2.2-1/-2 und Anhang XIII). Während neben der lokalen Blatinfektion auf den Moosbeeren mit *E. oxycocci* nur noch ein surculicoler Befallstyp aus Europa bekannt ist, treten jedoch auf der Heidelbeere zusätzlich ein surculicoles und auch ein systemisches Krankheitsbild auf. Eine besondere, keine Gallbildung hervorrufende Befallsform auf der Heidelbeere war schon von FÜCKEL (1861) bei seiner ursprünglichen Beschreibung von *Fusidium vaccinii* erwähnt worden. Als eigenständige Art wurde *E. myrtilloides* dann erstmals 1879 (SIEGMUND) geführt. Bald wurden unter dieser Art allerdings Exobasidien gefaßt, welche Sprosse bzw. ganze Pflanzen verschiedener Wirtsarten parasitieren und nicht nur die Form auf *V. myrtilloides* (z.B. JUEL 1912 - wenn auch dort als *E. vaccinii-myrtilloides* bezeichnet). In dem NANNFELDTschen Konzept wurde *E. myrtilloides* wieder auf die systemischen Pathogene der Heidelbeere begrenzt, indem für systemisch infizierende Exobasidien auf weiteren *Vaccinium* spp. neue Arten beschrieben wurden. Die Sequenz von *E. myrtilloides* aus GENBANK weist deutliche Unterschiede zu den übrigen hier verrechneten *Exobasidium*-Sequenzen auf, auch zu *E. arescens*. Da von der dritten Heidelbeeren

infizierenden Art, *E. aequale*, keine Vergleichsdaten vorliegen, müssen zukünftige Untersuchungen Aufschluß über die Eignständigkeit dieser schon 1917 (SACCARDO) beschriebenen Art geben, die den surculicolen Befall begrenzter Sproßabschnitte verursacht.

Nach dem NANNFELDTschen Artkonzept sind alle an *V. uliginosum* lokale Blattinfektionen auslösende *Exobasidium*-Isolate als *E. pachysporum* anzusprechen. Diese Befallsform auf der Rauschbeere wurde früher auch unter *E. vaccinii* geführt bis sie ebenfalls durch NANNFELDT (1981) Artrang erhielt. Daher waren auch zwei der hier untersuchten Stämme von dieser Wirtspflanze als *E. vaccinii* und nur Stamm RBF 737 schon als *E. pachysporum* in Kultur genommen worden. Von dem ursprünglich als *E. vaccinii* isolierten Stamm PB 4153 konnte die Sequenz der Domäne I der 26S rDNA bestimmt werden; sie ist mit der Referenzsequenz von *E. pachysporum* aus GENBANK identisch (siehe Anhang XIII). Von den beiden auf der Rauschbeere andere Befallsbilder auslösenden Exobasidien, *E. vaccinii-uliginosi* und *E. expansum*, liegen keine molekularen Vergleichsdaten vor. *E. vaccinii-uliginosi* wurde schon frühzeitig auch aufgrund von anatomischen Merkmalen als eigene Art beschrieben (BOUDIER & FISCHER 1894) und infiziert einzelne Sprosse. Hingegen wurde auch *E. expansum* erst von NANNFELDT (1981) als Art umschrieben, nachdem diese systemische Form zuvor unter *E. myrtilli* („*E. vaccinii-myrtilli*“) geführt wurde. Die RFLP-Muster der aufgrund des Befallsbildes *E. pachysporum* zuzuordnenden Stämme von *V. uliginosum* weisen allerdings geringfügige Unterschiede auf, weshalb sie sich auf zwei RFLP-Gruppen (IV und XV, siehe Abb.3.1.3.4-1/-2) aufteilen, aber in der Ähnlichkeitsanalyse der RFLP-Muster gemeinsam clustern und eine der wenigen Gruppierungen mit Unterstützung in dem „Enzym-Jackknifing“ der PCR-RFLP-Daten bilden (siehe Abb.3.1.3.4-3). Beide RFLP-Gruppen weisen PCR-Produkte der 2.6 kb Größenklasse auf, deren Restriktionsmuster bei fünf von sechs Enzymen identisch sind (siehe Abb.3.1.3.2.2-1) und welche ein Intron vom Typ a1 enthalten (siehe Abb.3.3-1). Wie im folgenden Kapitel auch für Exobasidien von Azaleen erläutert wird, kann in dieser PCR-Produktgrößenklasse die Ursache für geringe Unterschiede in den Restriktionsmustern, wie sie hier zwischen den RFLP-Gruppen IV und XV bei *Taq* I auftreten, außerhalb der kodierenden rDNA-Sequenzen in den Group-I-Introns vermutet werden. Da das Auftreten der Introns nicht artspezifisch ist (siehe Kapitel 4.2), dürften auch geringe Sequenzunterschiede in diesem Bereich einer Konspezifität der Stämme kaum widersprechen. Die Stämme der RFLP-Gruppen IV und XV werden daher hier als *E. pachysporum* angesprochen.

Blattgallen und begrenzte Blattflecken hervorrufende Exobasidien auf verschiedenen Wirten wurde lange Zeit innerhalb der Typusart *E. vaccinii* geführt, unabhängig davon ob ansonsten enger oder weiter gefaßte Artkonzepte vertreten wurden. Während dabei meist ein Wirtsspektrum verschiedener *Vaccinium* spp. bzw. Angehöriger der Vaccinioideen angenommen wird (JUEL 1912, LAUBERT 1932, DONK 1966), finden sich auch Auffassungen, die



darüber hinaus u.a. auch *Rhododendron* spp. als Wirte einschließen (LIND 1913, BURT 1915, SAVILE 1959a). Erst NANNFELDT (1981) grenzte in seiner Bearbeitung der europäischen Exobasidien, wie oben geschildert, die Formen auf anderen Wirtsarten konsequent von *E. vaccinii* als eigenständige Arten ab, wobei er sich auch auf die Ergebnisse der physiologischen Untersuchungen von SUNDSTRÖM (1964) stützt. Die Abtrennung dieser Arten findet in den hier vorgestellten Sequenzvergleichen der Domäne I der 26S rDNA ihre Bestätigung, denn in der phylogenetischen Analyse (siehe Abb.3.4-1 bis -4) ist *E. vaccinii* deutlich von den oben besprochenen lokal infizierenden Exobasidien anderer Vaccinien getrennt; entweder steht die Typusart sehr basal innerhalb der Exobasidiales oder aber als Schwestertaxon zu *E. karstenii*.

Die Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit zeigen keinen Fall, welcher der Wirtsspezifität der europäischen Exobasidien auf *Vaccinium* spp. gemäß dem NANNFELDTschen Artkonzept widersprechen würde. Im Gegensatz dazu stellen sich aber die Verhältnisse im Hinblick auf das ausgelöste Befallsbild, ein zweites wichtiges Kriterium im NANNFELDTschen Konzept, komplizierter dar. Mit den rDNA-Daten können die von *V. vitis-idaea* isolierten *Exobasidium*-Stämme nicht entsprechend den ausgelösten Symptomen differenziert werden. Sie zeigen identische RFLP-Muster (siehe Abb.3.1.3.4-1/-2) und maximal ein Basenpaar Unterschied innerhalb der Domäne I der 26S rDNA (siehe Abb.3.2.2-1/-2 und Anhang XIII), unabhängig davon ob sie lokale Gallbildungen oder systemische Infektionen verursachen. Wenn auch bei einzelnen Stämmen das Befallsbild unbekannt bzw. ungenügend charakterisiert ist, so wurden andere Stämme schon bei ihrer Kultivierung entsprechend dem NANNFELDTschen Kriterien angesprochen, so RBF 763 und RBF 765 als *E. vaccinii* und RBF 727 als *E. juelianum* (siehe Tab.4.3.1-1 und auch die Auflistung in Kapitel 2.1). Die bisher angewandten molekularen Marker vermögen es aber nicht, solche Stämme von *V. vitis-idaea* zu differenzieren. In Relation zu den in den Sequenzen der 26S rDNA sich widerspiegelnden genetischen Distanzen zwischen den anderen *Exobasidium*-Arten von Vaccinien spricht die gemeinsame Gruppierung bei GC-Wert-, DNA-DNA-Homologie-, RFLP- und Sequenz-Daten für eine Konspezifität zwischen den hier untersuchten Stämme von Preiselbeeren sowie auch mit den Stämmen, die den aus GENBANK hinzugenommen Referenzsequenzen zugrunde liegen. Dies ist umso erstaunlicher als sich eine Unterscheidung von Exobasidien als Formen und auch Arten, welche mit den Befallsformen korrelieren, wesentlich eher durchsetzte als eine solche nach Wirtspflanzen, da dabei teilweise auch anatomische Unterschiede festgestellt wurden (u.a. THOMAS 1897, JUEL 1912, LIND 1913, DONK 1966). Andererseits kann das Befallsbild manchmal schwierig zuzuordnen sein. Selbst WORONIN (1867) beschreibt schon untypische und seltene Infektionsverläufe durch *E. vaccinii*, wenn nicht typische Blattgallen gebildet werden, sondern Sproßteile, Triebspitzen oder Verzweigungsstellen hypertroph und geschwollen-deformiert sind. BEGEROW *et al.* (2002a) schlossen daher auch zwei Formen (Stamm RB 945, AF009858 - Gallbildung,

Stamm RB 2073, AF487398 - hypertrophierte Sproßspitze) in ihre molekulare Analyse der Exobasidiales ein, welche beide gemeinsam und hier in der *E. vaccinii*-Gruppe clustern. Unterschiede in den Symptomen können von äußeren Parametern wie beispielsweise dem Infektionszeitpunkt und -ort abhängen. Eine Abhängigkeit des Erscheinungsbildes der Infektion von *Andromeda ligustrina* Muhl. mit *E. andromedae* Peck vom jahreszeitlichen Verlauf ist experimentell belegt, denn bei künstlichen Infektionen konnten sonst im Freiland auf demselben Wirt zu anderen Zeiten auftretende Formen hervorgerufen werden (RICHARDS 1896). Auch können mit *E. japonicum* nur zu einem bestimmten Zeitpunkt der Blattentwicklung experimentell Infektionen ausgelöst werden (GRAAFLAND 1960). Konspezifität von gallbildenden Formen einerseits und systemisch infizierenden Formen andererseits bedeutet darüber hinaus, daß auf die Ausprägung unterschiedlicher Krankheitsbilder bei der Preiselbeere Faktoren einen Einfluß ausüben, der sonst durch unterschiedliche Arten angehörende Pathogene hervorgerufen wird. Da *E. juelianum* in speziellen Habitaten vorkommt (NANNFELDT 1981), wären hier gezielte Infektionsversuche und Freilanduntersuchungen zur Klärung des Verhältnisses von Symptomatik und Standortparametern wünschenswert. Der Komplex der Stämme von *V. vitis-idaea* in der RFLP-Gruppe V, der „*E. vaccinii* - *E. juelianum*-Gruppe“, ist trotz der unterschiedlichen Krankheitsbilder unter der Art *E. vaccinii* zu führen.

NANNFELDT (1981) unterscheidet neben den gallbildenden und systemisch infizierenden Form allerdings mit *E. splendidum* noch eine dritte Art, die begrenzte Infektionen des surculicolen Typs auf Preiselbeeren verursacht und in den hier bearbeiteten Stämmen wohl nicht vertreten war. In früheren Untersuchungen waren zwei sich abweichend verhaltende Stämme von *V. vitis-idaea* enthalten, die leider nicht mehr zur Verfügung standen: FO 23898 in der DNA-DNA-Homologie-Gruppe B (BLANZ 1986, siehe Anhang IV) und PB 4162 in der GC-Wert-Gruppe 2, der auch einen *E. splendidum* entsprechenden Befallstyp aufwies (BLANZ & OBERWINKLER 1983, siehe Anhang III). Da für andere Stämme der GC-Wert-Gruppe 2/DNA-DNA-Homologie-Gruppe B hier gezeigt ist, daß sie zwei *Exobasidium*-Arten zusammenfaßten (siehe Kapitel 4.2 und Tab.4.3-1), können die Stämme von *V. vitis-idaea* mit einem GC-Wert von 48%, der gut 8% über demjenigen von *E. vaccinii* liegt, tatsächlich einer weiteren, Preiselbeeren parasitierenden Art angehören und somit *E. splendidum* repräsentieren. Nach den vorliegenden molekularen Daten wären damit von zwei *Exobasidium*-Arten auf der Preiselbeere auszugehen, was auch mit anatomischen Befunden korreliert. Während nämlich *E. vaccinii* und *E. juelianum* hauptsächlich viersporige Basidien und etwa gleich große Sporen bilden, weist *E. splendidum* nur zweisporige Basidien auf und bildet wesentlich größere Sporen (SUNDSTRÖM 1964, NANNFELDT 1981).

Die Artabgrenzung der Exobasidien auf *V. vitis-idaea* kann mit den hier untersuchten Stämmen nicht abschließend geklärt werden und dieser Artkomplex bedarf weiterer Untersuchungen. Hierzu wird es auch notwendig sein, Material aus anderen Verbreitungsgebieten

dieser Wirtspflanzengruppe einzubeziehen. So wurden in Amerika einerseits weitere *Exobasidium*-Arten auf *Vaccinium* spp. beschrieben, aber andererseits auch Befallsformen auf anderen Wirtsarten *E. vaccinii* zugeordnet, v.a. in Nordamerika (BURT 1915, HOTSON 1927, SAVILE 1959a, NICKERSON 1984, NICKERSON & VANDER KLOET 1997), aber auch in tropischen Gebieten (GÓMEZ & KISIMOVA-HOROVITZ 1997, 1998). Da bei Infektionsversuchen mit *Exobasidium* spec. isoliert von *V. angustifolium* an nordamerikanischen *Vaccinium*-Arten typische Symptome an nah verwandten Wirtsarten sowie darüber hinaus untypische Läsionen auch bei weiteren Arten auftraten (NICKERSON & VANDER KLOET 1997) und neuere molekularsystematische Analysen zudem belegen, daß die Gattung *Vaccinium* nicht monophyletisch ist (KRON *et al.* 2002), sollten Vertreter aus der Tribus Vaccinieae aus dem amerikanischen Raum und ihre *Exobasidium*-Pathogene in zukünftigen Analysen berücksichtigt werden.

#### **4.3.2 Zu *Exobasidium* spp. auf *Rhododendron*-Wirten (inklusive *Azalea indica* und *Menziesia ferruginea*)**

Die Umgrenzung der artenreichen Gattung *Rhododendron*, v.a. auch die Einordnung der laubabwerfenden Azaleen, wurde lange Zeit kontrovers gehandhabt (für einen historischen Überblick siehe KRON & JUDD 1990). Kladistische Analysen morphologisch-anatomischer Merkmale und auch molekularsystematische Analysen zeigen jedoch eindeutig, daß die Gattung *Rhododendron* bei Anerkennung einer eigenständigen Gattung *Azalea* L. polyphyletisch wäre, da Azaleen an mehreren Stellen innerhalb der *Rhododendron* clustern (KRON & JUDD 1990, KURASHIGE *et al.* 2001). Azaleen finden sich daher heute in mehreren *Rhododendron*-Untergattungen, wobei *Rh. indicum*, der Wirt von *E. japonicum*, in der Untergattung *Tsutsusi* (Sweet) Pojark. geführt wird (CHAMBERLAIN & RAE 1990). Auch für die Gattung *Menziesia* Sm., die in wenigen, aber auffälligen morphologisch-anatomischen Charakteristika von *Rhododendron* s.str. unterschieden ist, wird aufgrund der molekularen Daten eine systematische Einordnung innerhalb der Gattung *Rhododendron* vorgeschlagen (KURASHIGE *et al.* 2001). Die hier untersuchten *Exobasidium*-Stämme von Wirtspflanzen aus diesem Verwandtschaftskreis finden sich in insgesamt 10 RFLP-Gruppen (siehe Abb.3.1.3.4.-1/-2). Während sich bei den Ähnlichkeitsanalysen der RFLP-Daten ein deutlicher Einfluß der PCR-Produktgrößen und damit der innerhalb der 26S rDNA vorhandenen Introns zeigt (siehe auch Kapitel 4.2), ergeben die Sequenzvergleiche der Domäne I der 26S rDNA innerhalb einer monophyletischen Gruppe der *Rhododendron*-Parasiten eine Gliederung entsprechend der systematischen Zuordnung und dem geographischen Ursprung der Wirtspflanzen. Wirte asiatischer und nordamerikanischer Herkunft treten bei *E. yoshinagai* und innerhalb der *E. japonicum* - *E. shiraianum*-Gruppe auf, während *Exobasidien* europäischer Wirte die verschiedenen *E. rhododendri*-Gruppen bilden (siehe Abb.3.2.2-1 bis -3).

Auf europäischen *Rhododendron*-Arten sind nur wenige Exobasidien beschrieben, die aufgrund der unterschiedlichen Verbreitungsgebiete ihrer Wirtspflanzen in verschiedenen Arealen vorkommen (NANNFELDT 1981, siehe Tab.1.2-1). Für die im Alpenraum verbreiteten *Rh. ferrugineum*, *Rh. hirsutum* und deren Hybriden *Rh. x intermedium*, von denen hier *Exobasidium*-Isolate untersucht wurden, ist als einzige infizierende und auffällige Gallen hervorrufende *Exobasidium*-Art *E. rhododendri* beschrieben. Zwei weitere Arten werden auf dem im Kaukasus und Anatolien vorkommenden *Rh. luteum* akzeptiert, wobei *E. horvathianum* ebenfalls Gallen hervorrufen. Und schließt man die Gattung *Ledum* L. in *Rhododendron* ein (wie bei KRON & JUDD 1990, KURASHIGE *et al.* 2001), so kommen noch zwei weitere Exobasidien in Nordeuropa hinzu (siehe NANNFELDT 1981). Hingegen sind im asiatischen Raum und Nordamerika für die dort mit wesentlich größerer Artenvielfalt vertretene Gattung *Rhododendron* auch viele *Exobasidium*-Arten beschrieben (LAUBERT 1932, DONK 1966, OTANI 1976, NAGAO *et al.* 2003).

Die Gallen auf der Alpenrose wurden zwar zunächst als eine Form von *E. vaccinii* beschrieben (FUCKEL 1873/1874), aber schon bald als eigenständige Art betrachtet (CRAMER 1875), welche bei Bearbeitungen der europäischen Exobasidien im allgemeinen auch Anerkennung fand (LAUBERT 1932, DONK 1966, NANNFELDT 1981). Es finden sich in der Literatur keine Hinweise auf morphologische oder anatomische Unterschiede zwischen *Exobasidium*-Gallen auf Alpenrose und Almrausch. So ist dann in der Arbeit von SUNDSTRÖM (1964) auch nur ein einziges Isolat von *Rh. ferrugineum* zum physiologischen Vergleich mit Exobasidien von anderen Wirten enthalten, und auch NANNFELDT (1981) erkennt *E. rhododendri* als Parasiten auf den nah verwandten alpenländischen Rhododendren an. Erste Unterschiede zwischen verschiedenen *E. rhododendri*-Stämmen lieferte die GC-Wert-Analyse von BLANZ & OBERWINKLER (1983, siehe Anhang III), in der zwei Gruppen mit um 8% auseinanderliegenden GC-Werten auftreten. Dies bestätigte später die DNA-DNA-Homologie-Untersuchung, in der sogar mindestens drei nicht-konzeptifische Gruppen auf diesen *Rhododendron*-Arten nachgewiesen wurden (BLANZ 1986, BLANZ & DÖRING 1995, siehe Anhang IV). Die hier vorgelegte phylogenetische Analyse zeigt zwar, daß es sich bei einer dieser Gruppen um einen Vertreter der Entylomatales handelt (siehe Kapitel 4.1), aber trotzdem bestätigen die 26S rDNA-Daten eine Heterogenität von *E. rhododendri* und zeigen sogar ein erhebliches Maß an genetischer Differenzierung. Bei den *Exobasidium*-Stämmen von europäischen Rhododendren werden hier zwar vier verschiedene RFLP-Muster unterschieden (siehe Abb.3.1.3.4-1/-2), aber die Ähnlichkeitsanalysen der 26S rDNA-Partialsequenzen der Domäne I (siehe Abb.3.2.2-1/-2) und Vergleiche mit den DNA-DNA-Homologie-Daten zeigen, daß zwei dieser RFLP-Gruppen (VIII und IX) nur aufgrund eines Introns differenziert werden und daher trotz der unterschiedlichen RFLP-Muster konzeptifisch sind; sie werden als „*E. rhododendri* b“ angesprochen (siehe hierzu auch Kapitel 4.2). Bei den hier unter-

suchten Exobasidien von europäischen Rhododendren können damit nach molekularen Merkmalen (Tab.4.3.2-1) drei nicht miteinander konspezifische Taxa differenziert werden.

**Tab.4.3.2-1: Gegenüberstellung der drei nicht-konspezifischen Gruppierungen der *Exobasidium*-Stämme von europäischen *Rhododendron* spp.** Bei vier unterschiedlichen RFLP-Mustern bilden drei Arten den *E. rhododendri*-Komplex. RFLP: Zugehörigkeit zu einer RFLP-Gruppe, PCR: Größe des 5'-Bereichs der 26S rDNA, DNA: Zugehörigkeit zu einer DNA-DNA-Homologie-Gruppe, 26S: Sequenzanalyse der Domäne I der 26S rDNA (a = „*E. rhododendri* a“, b = „*E. rhododendri* b“), ITS: Länge der ITS-Region (in bp). . = keine Daten.

RFLP	PCR	Stamm	Wirt	DNA	26S	ITS	
XI	2.2 kb	FO 31767	<i>Rh. ferrugineum</i>	x	a	516	„ <i>E. rhododendri</i> a“
XI	2.2 kb	PB 4381	<i>Rh. hirsutum</i>	x	a	516	
IX	2.2 kb	PB 5634	<i>Rh. x intermedium</i>	F	b	506	„ <i>E. rhododendri</i> b“
VIII	2.6 kb	FO 24040-2	<i>Rh. ferrugineum</i>	.	b	.	
VIII	2.6 kb	PB 4163	<i>Rh. ferrugineum</i>	F	.	.	
VIII	2.6 kb	PB 4380	<i>Rh. ferrugineum</i>	F	b	506	
VIII	2.6 kb	CBS 240.50	<i>Rh. hirsutum</i>	.	.	.	
X	2.2 kb	FO 24040-3	<i>Rh. ferrugineum</i>	x	.	.	„ <i>E. rhododendri</i> c“

Die beiden intron-freien RFLP-Gruppen X und XI sind von „*E. rhododendri* b“ durch fehlende DNA-DNA-Hybridisierungssignale mit der Sonde von Stamm PB 5634 unterschieden (siehe zur Erklärung auch Anhang IV). Diese beiden intron-freien RFLP-Gruppen der DNA-DNA-Homologie-Gruppe x mit unterschiedlichen RFLP-Mustern werden als „*E. rhododendri* a“ und „*E. rhododendri* c“ der über positive Hybridisierungssignale mit der Sonde PB 5634 charakterisierten Gruppe „*E. rhododendri* b“ gegenübergestellt, denn die abweichenden RFLP-Muster zwischen „*E. rhododendri* a“ und „*E. rhododendri* c“ bei allen sechs verwendeten Enzyme (siehe Abb.3.1.3.2.2-1) können bei dem intron-freien rDNA-Typ nur mit deutlichen Unterschieden in der kodierenden rDNA erklärt werden. Der Vergleich der Restriktionsmuster der drei intron-freien RFLP-Gruppen IX, X und XI weist sogar auf minimale Größenunterschiede der PCR-Amplifikate in der 2.2 kb Größenklasse hin. Die RFLP-Gruppen IX und X haben bei drei Enzymen identische Muster und damit gleich große PCR-Produkte. Bei einigen Enzymen zeigt RFLP-Gruppe XI im Vergleich zu RFLP-Gruppe X jedoch ein einzelnes in seiner Größe verschobenes Restriktionsfragment (vergleiche in Tab.3.1.3.3-1 *Hinf* I und *Msp* I). Dies deutet einen geringfügigen Längenpolymorphismus der PCR-Produkte an, der bei der Analyse der PCR-Produkt-Gelbilder nicht feststellbar war.

Der GENBANK-Eintrag AF009856 von *E. rhododendri* (Stamm RB 2050 von

*Rh. ferrugineum*, BEGEROW *et al.* 1997) ist in seiner Sequenz von den Vertretern von „*E. rhododendri* a“ und „*E. rhododendri* b“ deutlich verschieden. Die Frage, ob ein viertes eigenständiges Taxa innerhalb dieses *E. rhododendri*-Komplexes vorliegt oder ob dieser Stamm in die hier nicht sequenzierte „*E. rhododendri* c“-Gruppe gehört, kann mit den vorliegenden Daten nicht geklärt werden. In der Sequenzanalyse bilden jedoch alle analysierten *E. rhododendri*-Vertreter eine monophyletische Gruppe (siehe Abb.3.4-1 bis -4). Die Aufteilung auf zwei Cluster in der Ähnlichkeitsanalyse der RFLP-Daten (siehe Abb.3.1.3.4-1/-2) ist auf die PCR-Produktgrößenunterschiede und somit auf die Introns zurückzuführen.

Die Unterschiede zwischen verschiedenen *E. rhododendri*-Sequenzen innerhalb der Domäne I der 26S rDNA betragen bis zu 16 bp (siehe Anhang XIII). Sie liegen damit erheblich über dem für konspezifische Stämme im allgemeinen akzeptierten Umfang (KURTZMAN & ROBNETT 1998, FELL *et al.* 2000). Die 2 bp Differenz innerhalb der „*E. rhododendri* b“-Gruppe liegen hingegen innerhalb dieses Bereiches. Vergleicht man darüber hinaus die genetischen Distanzen zwischen den verschiedenen Gruppen des *E. rhododendri*-Komplexes mit den zwischen anderen *Exobasidium*-Arten auftretenden Distanzen, so zeigt sich eine vergleichbare Größenordnung (vergleiche in Abb.3.2.2-1/-2 *E. arescens*, *E. bisporum*, *E. pieridis-ovalifoliae* und *E. rostrupii*). Während oben gezeigt wurde, daß nah verwandte *Exobasidium*-Arten mit DNA-DNA-Homologie-Daten nicht immer zu differenzieren waren (DNA-DNA-Homologie-Gruppe B, siehe Kapitel 4.2), korrelieren bei den *Exobasidium*-Stämmen von europäischen Rhododendren mangelnde DNA-DNA-Hybridisierungssignale mit eindeutigen Sequenzunterschieden. Die hier durchgeführten phylogenetischen Vergleiche der 26S rDNA-Sequenzen in Zusammenschau mit den DNA-DNA-Homologie-Daten zeigen das Auftreten mehrerer, molekular unterscheidbarer *Exobasidium*-Arten auf europäischen Rhododendren an. Dies entspricht dem Phänomen der „kryptischen Speziation“, das in jüngster Zeit bei Pilzen vermehrt beschrieben wird (TAYLOR *et al.* 2000, CRUSE *et al.* 2002, STEENKAMP *et al.* 2002, CHAVERRI *et al.* 2003). Morphologisch-anatomische Differenzierungen innerhalb *E. rhododendri* sind bisher nicht bekannt. Geographische Differenzierungen scheinen in diesem Artkomplex, in dem Stämme von „*E. rhododendri* b“ und „*E. rhododendri* c“ ja sogar von derselben Pflanze isoliert wurden, höchstens eine untergeordnete Rolle zu spielen. Und mit den Wirtsarten korreliert die Auftrennung ebenfalls nicht, womit sie auch in Widerspruch zu dem NANNFELDTschen Artkonzept steht.

Die *Exobasidium*-Stämme von asiatischen und nordamerikanischen Rhododendren werden ebenfalls in mehrere RFLP-Gruppen untergliedert (siehe Abb.3.1.3.4-1/-2), wobei die vier mit Stämmen von *Rh. indicum* und *Rh. degrobianum* eine der wenigen stabilen beim „Enzym-Jackknifing“ der RFLP-Daten auftretenden Gruppierungen bilden (siehe Abb. 3.1.3.4-3). Die Ähnlichkeitsanalyse der 26S rDNA-Parialsequenzen der Domäne I vermag zwischen einzelnen Vertretern nicht zu differenzieren; sie bilden die *E. japonicum* - *E. shirai-*

*anum*-Gruppe (siehe Abb.3.2.2-1/-2). Die RFLP-Muster dieser vier Gruppen in der 2.6 kb PCR-Produktgrößenklasse sind sich sehr ähnlich, bei drei Enzymen sogar identisch (siehe Abb.3.1.3.2.2-1). Da in der Domäne I der 26S rDNA keine Sequenzunterschiede zu finden sind, könnten die unterschiedlichen RFLP-Muster auf solche innerhalb der in der 2.6 kb PCR-Produktgrößenklasse vorhandenen Introns vom Typ a1 (siehe Abb.3.3-1) zurückzuführen sein. Tab.4.3.2-2 listet die der *E. japonicum* - *E. shiraianum*-Gruppe zugeordneten Stämme auf. Nur von Stamm PB 3684 liegen molekulare Vergleichsdaten vor; er gehört der DNA-DNA-Homologie-Gruppe x an und weist einen GC-Wert von 40,3% auf.

**Tab.4.3.2-2: Die Stämme der *E. japonicum* - *E. shiraianum*-Gruppe von nicht-europäischen *Rhododendron* spp.** Die vier RFLP-Gruppen gehören der 2.6 kb Größenklasse an. Mit Sequenzen der Domäne I der 26S rDNA werden sie nicht differenziert. RFLP: Zugehörigkeit zu einer RFLP-Gruppe, DNA: Zugehörigkeit zu einer DNA-DNA-Homologie-Gruppe, 26S: Sequenzanalyse der Domäne I der 26S rDNA (+ = identische Sequenzen, o = 1 bp Sequenzunterschied dazu). . = keine Daten. Siehe zu den 'Einsporkulturen' von PB 4898 auch Tab.4.1-2.

RFLP	Stamm	Wirt	Art	DNA	26S	
XII	CBS 157.85	<i>Rh. degronianum</i>	<i>E. shiraianum</i>	.	+	<b><i>E. japonicum</i> - <i>E. shiraianum</i>- Gruppe</b>
XIII	PB 3684	<i>Rh. indicum</i> cult.	<i>E. japonicum</i>	x	+	
	PB 4898-17/-18	<i>Rh. spec.</i>	<i>E. rhododendri</i>	.	o	
XIV	RBF 724	<i>Rh. indicum</i>	<i>E. japonicum</i>	.	+	
XVI	CBS 153.85	<i>Rh. indicum</i>	<i>E. japonicum</i>	.	.	

Die identischen Sequenzen der Domäne I der 26S rDNA stimmen mit der für die *E. japonicum*-Stämme zu erwartenden Konspezifität überein. Die geringe Differenzierung der gallbildenden *E. japonicum*-Stämme mit drei Enzymen bei den RFLP-Analysen wird hier als innerartliche Variabilität interpretiert. Bei allen anderen in dieser Arbeit analysierten *Exobasidium*-Arten stammen die untersuchten Stämme aus einem relativ begrenzten Gebiet, meist aus dem Alpenraum. Bei *E. japonicum* hingegen sind zwei Stämme in Japan isoliert worden und Stamm PB 3684 in einer Gärtnerei in Deutschland. *E. japonicum* kam gemeinsam mit Zierazaleen aus Asien nach Europa (siehe GRAAFLAND 1960). Die mit den PCR-RFLP-Analysen gefundene Variabilität könnte daher mit geographischen Aspekten verbunden sein.

Erstaunlicherweise ist aber auch der *E. shiraianum*-Stamm CBS 157.85 weder in seinen RFLP-Mustern noch in den Sequenzen der Domäne I der 26S rDNA von den *E. japonicum*-Stämmen abgesetzt. Besonders auffallend ist das Unvermögen der Sequenzen der Domäne I der 26S rDNA hier zu differenzieren, wenn man an die gerade besprochenen Unterschiede in dem *E. rhododendri*-Komplex denkt. Vergleicht man die *E. japonicum* - *E. shiraianum*-Gruppe mit den in den Sequenzanalysen zwischen allen übrigen verrechneten

*Exobasidium*-Arten gefundenen Distanzen, so erscheint der taxonomische Status der beiden Arten *E. japonicum* und *E. shiraianum* fraglich. *E. shiraianum* wurde als ein Blätter infizierendes, aber nicht nennenswert deformierendes *Exobasidium* auf *Rh. metternichii* Siebold & Zucc. beschrieben (HENNING 1902 ("1903")). *Rh. metternichii* wird heute als synonym mit einer Varietät von *Rh. japonicum* (Blume) C.K.Schneid. betrachtet und in der Untergattung *Hymenanthes* (Blume) K.Koch geführt (CHAMBERLAIN 1982). Auch *Rh. degronianum*, der Wirt des hier untersuchten *E. shiraianum*-Stammes, wird als synonym zu einer anderen *Rh. japonicum*-Varietät angesehen. Die Wirte von *E. shiraianum* und *E. japonicum* gehören somit verschiedenen Untergattungen an. Hier gruppieren also nicht *Exobasidien* von nächst verwandten Wirten zusammen, wie es entsprechend den im vorigen Kapitel besprochenen *Exobasidien* von *Vaccinium* spp. und nach dem NANNFELDTschen Artkonzept zu erwarten wäre. Auch das Befallsbild ist unterschiedlich. Wenn auch beide Arten einen lokalen Befall verursachen, so ruft nur *E. japonicum* eine Gallbildung hervor. Von beiden Wirtsarten ist jeweils noch eine zweite *Exobasidium*-Art bekannt. *E. hemisphaericum* Shirai verursacht weißliche Gallbildungen an *Rh. metternichii* und *E. pentasporium* führt zur Bildung von Hexenbesen bei *Rh. indicum* (SHIRAI 1896). Von diesen beiden *Exobasidien* liegen jedoch keine Vergleichsdaten vor. Sie dürften für eine Bewertung dieser Artengruppe aber interessant sein. In zukünftigen Untersuchungen sollte geprüft werden, ob diese Gruppe auch mit unabhängigen molekularen Markern Bestand hat. Nur mit den vorliegenden 26S rDNA-Sequenzen kann eine verglichen mit anderen *Exobasidium*-Arten rezentere Speziation oder auch das Auftreten geringerer Substitutionsraten nicht ausgeschlossen werden. Unterschiede in den Substitutionsraten verschiedener phylogenetischer Linien treten nicht nur zwischen Großgruppen auf (BRUNS *et al.* 1992, KURTZMAN & BLANZ 1998, VAN DE PEER *et al.* 2000), sie werden auch bei nah verwandten Taxa gefunden (MONCALVO *et al.* 1995b, HIBBETT *et al.* 1998).

Zusätzlich befinden sich in der *E. japonicum* - *E. shiraianum*-Gruppe auch noch die *Exobasidium*-Stämme der 'Einsporkulturen' von PB 4898 (-17 bzw. -18), die als *E. rhododendri* von einer nicht näher bestimmten *Rhododendron*-Art in Kanada isoliert worden waren. Diese zeigen ein übereinstimmendes RFLP-Muster mit einem der *E. japonicum*-Stämme, und auch die Sequenzanalyse ergibt nur 1 bp Unterschied zu den *E. japonicum*- bzw. *E. shiraianum*-Stämmen (siehe Anhang XIII). In Nordamerika werden gallbildende *Exobasidien* an verschiedenen *Rhododendron* spp. häufig unter *E. vaccinii* geführt (BURT 1915, SAVILE 1959a). Die hier vorgestellten molekularen Daten von vorwiegend aus dem europäischen Raum stammenden *Exobasidien* liefern, wie oben schon beschrieben, keinerlei Hinweis auf ein solches Gattungsgrenzen überschreitendes Wirtsspektrum. Jedoch sind auch *Exobasidium*-Arten auf nordamerikanischen *Rhododendren* zusätzlich beschrieben worden, so mit *E. azalea* Peck und *E. discoideum* Ellis auch zwei Arten auf Azaleen (siehe LAUBERT 1932, DONK 1966). Da der nicht näher bestimmte Wirt von PB 4898-17/-18 in einem bota-



nischen Garten wuchs und da das Auftreten der asiatischen Art *E. japonicum* auf Zierazaleen in Europa (siehe GRAAFLAND 1960) belegt, daß *Exobasidium*-Arten ihren Wirten in neue Areale folgen können, kann auch die Einordnung von PB 4898-17/-18 in die *E. japonicum* - *E. shiraianum*-Gruppe auf einen solchen Effekt hindeuten und nicht auf eine verwandtschaftliche Nähe nordamerikanischer zu asiatischen *Exobasidium*-Arten.

Ebenfalls aus Nordamerika stammen die von *Menziesia ferruginea* isolierten 'Einsporkulturen' von PB 4864. Diese bilden zwar zwei RFLP-Gruppen, welche aber in den Ähnlichkeitsanalysen der RFLP-Daten trotz unterschiedlicher PCR-Produktgrößen gemeinsam gruppieren (siehe Abb.3.1.3.4-1/-2) und hier einer Art zugeordnet werden (siehe Kapitel 4.2). Je nach Auswertverfahren finden sie Anschluß an andere RFLP-Gruppen, ohne besondere Affinitäten zu Stämmen der *E. japonicum* - *E. shiraianum*-Gruppe zu zeigen. Sie stellen damit wohl ein weiteres, eigenständiges Taxa innerhalb der DNA-DNA-Homologie-Gruppe x dar. Die hier vorgestellten Analysen belegen, daß diese DNA-DNA-Homologie-Gruppe x (BLANZ 1986, BLANZ & DÖRING 1995, siehe Anhang IV) mit Stämmen von verschiedenen *Rhododendron* spp. in sich nicht homogen ist und Vertreter mehrerer *Exobasidium*-Arten umfaßt. In Zukunft wird eine weitere Bearbeitung amerikanischen Materials für ein besseres Verständnis der auf Rhododendren lebenden Exobasidien notwendig sein.

In den Sequenzvergleichen ist neben *E. japonicum* mit dem GENBANK-Eintrag von *E. yoshinagai* eine zweite *Exobasidium*-Art von einem Wirt aus der Untergattung *Tsutsusi* vertreten. Diese Art ruft lokal Blattflecken hervor und wurde ursprünglich auf *Rh. tosaense* Makino beschrieben (HENNING 1902), während der dem GENBANK-Eintrag zugrunde liegende Stamm DSM 4524 von *Rh. reticulatum* stammt (AF487399, BEGEROW *et al.* 2002a), ebenfalls einem Angehörigen dieser Untergattung (CHAMBERLAIN & RAE 1990). Diese Sequenz ist deutlich von der *E. japonicum* - *E. shiraianum*-Gruppe unterschieden (siehe Abb.3.2.2-1/-2), was die verwandtschaftliche Nähe der Stämme von *E. japonicum* und *E. shiraianum* unterstreicht. Mit den hier vorgestellten molekularen Analysen an einigen *Exobasidium*-Arten von *Rhododendron* spp. erscheinen die Artabgrenzungen in dieser Gruppe komplizierter und keinem so einheitlichen Prinzip folgend wie bei den Exobasidien von Wirten der Gattung *Vaccinium*.

### **4.3.3 Molekulare Marker und die Charakterisierung von *Exobasidium*-Arten**

In der Gattung *Exobasidium* liegen zur molekularen Charakterisierung von Stämmen neben GC-Werten (BLANZ & OBERWINKLER 1983) und DNA-DNA-Homologien (BLANZ 1986, BLANZ & DÖRING 1995) nun PCR-RFLP-Daten des 5'-Bereichs der 26S rDNA (diese Arbeit, BLANZ & DÖRING 1995) sowie Sequenzen der Domäne I der 26S rDNA (diese Arbeit,

BEGEROW *et al.* 2002a) vor. Der umfangreichste Datensatz mit der größten Anzahl an Stämmen liegt mit den PCR-RFLP-Daten vor. Wie in den vorhergehenden Kapiteln ausgeführt, spricht eine Übereinstimmung in den RFLP-Mustern des 5'-Bereichs der 26S rDNA bei allen sechs Enzymen für die Zugehörigkeit zu einer *Exobasidium*-Art, da Stämme mit identischem PCR-Fingerprint homologe DNAs und einen gleichen GC-Gehalt aufweisen. Im Gegensatz dazu können ungleiche RFLP-Muster die Zugehörigkeit zu einer Art nicht widerlegen. Wie die Sequenzdaten zeigen, kann eine *Exobasidium*-Art in mehrere RFLP-Gruppen zerfallen, wenn dies dem Verteilungsmuster der Group-I-Introns entspricht. In ersten Arbeiten mit PCR-RFLPs der 26S rDNA wurde häufig nur ein die Domänen I und II umfassendes Amplifikat analysiert, das allerdings z.T. auch noch den zweiten internen transkribierten Spacer umfaßte (VILGALYS & HESTER 1990, CUBETA *et al.* 1991, HIBBETT & VILGALYS 1991). Der hier mit PCR-RFLPs analysierte Teil der 26S rDNA umfaßt hingegen den gesamten 5'-Bereich der 26S rDNA bis hinein in die Domäne IV und enthält mit den beiden divergierenden Regionen D2 und D8 (siehe Anhang II) zwei der variabelsten Abschnitte der 26S rDNA (vergleiche ALI *et al.* 1999). Dieser Bereich zeigt eine ausreichende Variabilität zur Differenzierung von Stämmen der Gattung *Exobasidium*. Die PCR-RFLP-Analyse der 26S rDNA erweist sich als einfacher Weg, um genetisch einheitliche Stämme zu erkennen, nicht jedoch um in allen Fällen Konspezifität zu beweisen. Diese Art eines PCR-Fingerprintings ist eine schnelle Methode, um genetisch unterschiedliche, d.h. in ihrem RFLP-Muster abweichende Stämme zu differenzieren. Die Auswertung der PCR-RFLP-Gelbilder zur Feststellung übereinstimmender Muster ist einfach, und dabei kann auf die aufwendigen Auswertungen zur Homologisierung von Fragmenten in einer 0/1-Matrix verzichtet werden.

Bei BLANZ & DÖRING (1995) wurden die RFLP-Gruppen I bis XIV nach Restriktionsmustern von fünf Enzymen aufgestellt. Auch mit den zusätzlichen Daten von *Cfo* I bleibt die Zuordnung der Stämme gleich. Die hier neu vorgestellten RFLP-Gruppen XV bis XX beruhen auf der Analyse zusätzlicher Stämme. Jedoch führt die Vergrößerung der Datenmatrix zu Änderungen in den RFLP-Dendrogrammen. Eine phylogenetische Auswertung von PCR-RFLP-Mustern und die Bestimmung von Schwertertaxa ist nicht ungewöhnlich (z.B. HIBBETT & VILGALYS 1991, BUNYARD *et al.* 1995, EDEL *et al.* 1996, FISCHER 1996), wenn auch kritische Aspekte der phylogenetischen Interpretation von Restriktionsenzymdaten, wie der Einfluß ungleicher Basenzusammensetzungen oder die Erfassung konvergenter Änderungen, schon frühzeitig erkannt wurden (u.a. UPHOLT 1977, NEI & LI 1979, TEMPLETON 1983, BRUNS *et al.* 1991). Die hier vorgestellten PCR-RFLP-Daten sind für eine phylogenetische Interpretation zusätzlich wegen der durch die Group-I-Introns verursachten Längenpolymorphismen schlechter geeignet. Denn diese bewirken, daß auch ungleich große Fragmente einem zwischen homologen Restriktionsschnittstellen gelegenen Genabschnitt entsprechen können. Zumal trotz der aufwendigen Analysen die Erstellung der 0/1-Matrix nicht problemlos ist, be-

ruhen in dieser Arbeit phylogenetische Interpretationen ausschließlich auf Sequenzdaten, während die RFLP-Dendrogramme nur der Veranschaulichung der Ähnlichkeiten zwischen den verschiedenen RFLP-Mustern dienen. So enthält die 0/1-Matrix bei *Taq* I und bei *Cfo* I z.B. keine Fragmente unter 100 bp Größe, da solche trotz der CAM-Hilfsmittel praktisch nicht detektiert werden konnten. Und bei den RFLP-Gruppen IV und XV sind die RFLP-Muster bei fünf Enzymen identisch, während bei *Taq* I ein einziges in seiner Größe verschobenes Fragment vorhanden zu sein scheint (vergleiche Tab.3.1.3.3-1). Eventuell nicht detektierte, kleinste Fragmente könnten solche Effekte verursachen. Da sie bestehende Unterschiede zwischen den Restriktionsmustern jedoch höchstens verstärken, ist die hier vorgenommene Differenzierung der Stämme nach den PCR-RFLP-Daten davon nicht betroffen.

Auch sind die Sequenzdaten der Domäne I der 26S rDNA, die divergierenden Regionen D1 und D2 enthaltend (siehe Anhang II), zur Artabgrenzung in der Gattung *Exobasidium* gut geeignet, da sie nicht durch die Group-I-Introns beeinflusst sind. Über einen Vergleich mit Sequenzen neuer Isolate oder mit Referenzsequenzen aus GENBANK ist damit eine Zuordnung von früher angelegten *Exobasidium*-Kulturen zu solchen möglich, die später nach dem NANNFELDTschen Artkonzept bestimmt wurden. Wenn eine Übereinstimmung von Sequenzen der Domäne I der 26S rDNA alleine ebenfalls nur ein Hinweis auf Konspezifität ist (KURTZMAN & BLANZ 1998, KURTZMAN & ROBNETT 1998, FELL *et al.* 2000), so zeigt der Vergleich mit qualitativen Merkmalen wie der DNA-DNA-Homologie, daß in der Gattung *Exobasidium* damit eine gute Differenzierung erreicht wird. Die PCR-RFLP-Analyse erweist sich hiermit als eine mögliche Screening-Methode, um genetisch verschiedene Stämme für weitergehende Sequenzanalysen auszuwählen. Mit den nun vorliegenden Sequenzdaten wird zukünftig auch eine spezifische PCR-Amplifikation direkt aus *Exobasidium*-befallenem Pflanzengewebe ohne aufwendige Kultivierungen möglich sein.

Die hier vorgestellten Analysen führen zwar zu einer neuen Interpretation der DNA-DNA-Hybridisierungssignale und zu einer kritische Betrachtung der GC-Wert-Unterschiede, jedoch ermöglicht gerade auch der Vergleich mit diesen beiden Merkmalskomplexen eine schlüssige Interpretation der hier erhobenen Daten. Während abweichende GC-Werte einen differenzierenden Charakter haben, bieten DNA-DNA-Hybridisierungen die Möglichkeit konspezifische Stämme über positive, signifikante Signale zu definieren (KURTZMAN 1985, JAHNKE 1987, BRUNS *et al.* 1991, KURTZMAN 1998). Die mehrfach angesprochene Heterogenität der GC-Wert-Gruppe 2 bzw. DNA-DNA-Homologie-Gruppe B belegt die Problematik der Interpretation einzelner, solch qualitative Daten liefernder Marker. Jedoch zeigt aber die DNA-DNA-Homologie-Gruppe F mit den beiden RFLP-Gruppen VIII und IX auch die Verlässlichkeit dieser qualitativen Daten auf. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, wie wichtig Vergleichsmöglichkeiten auch bei molekularen Markern zur Artumgrenzung sind (siehe auch VANDAMME *et al.* 1996). So wurden z.B. GC-Werte, DNA-DNA-Homologien

und 26S rDNA-Partialsequenzen auch erfolgreich zur Charakterisierung von Hefen der Gattung *Malassezia* Baill. eingesetzt (GUILLOT & GUÉHO 1995). Aus der Charakterisierung und Klassifizierung so merkmalsarmer Pilze wie den Exobasidien, die keine Fruchtkörper produzieren und kaum taxonomisch verlässliche Merkmale aufweisen, sind molekulare Merkmale nicht mehr wegzudenken, und die Sequenzen der Domäne I der 26S rDNA und deren Vergleich mit phylogenetischen Methoden erweist sich hierzu als äußerst hilfreich.

Die durchgeführten molekularen Untersuchungen liefern Einblicke in das Artkonzept der pflanzenpathogenen Gattung *Exobasidium*. Auch in der Gattung *Entyloma* wird mit 26S rDNA-Partialsequenzen ein Konzept höherer Wirtsspezifität favorisiert als es morphologische Merkmale nahelegen (BEGEROW *et al.* 2002b). Im allgemeinen geht man heute von einem starken Einfluß der Wirte in der Evolution der Brandpilze aus (BAUER *et al.* 2001b). Wirtsarten und das ausgelöste Befallsbild sind seit den Bearbeitungen europäischer Exobasidien durch SUNDSTRÖM (1964) und NANNFELDT (1981) Hauptmerkmale zur Klassifizierung in dieser Gattung. Sie sind heute auch Bestandteil taxonomischer Diagnosen (NICKERSON 1984, GÓMEZ & KISIMOVA-HOROVITZ 1998). Das von NANNFELDT vertretene Konzept wirtsspezifischer *Exobasidium*-Arten stützt sich v.a. auf physiologisch und serologisch differenzierte „Wirtsrassen“ (SUNDSTRÖM 1964). Es wurde durch die Ergebnisse der Bearbeitungen der Brandpilzgattung *Anthracoidea* beeinflusst, für deren Arten eine Spezifität für Wirte aus je einem Verwandtschaftskreis angenommen wird (KUKKONEN 1972, NANNFELDT 1979, VÁNKY 1979). Die Wirtspflanzen spielten in früheren Arbeiten über Exobasidien meist nur eine untergeordnete Rolle, während die Beschreibung spezifischer Befallsformen früh stattfand (THOMAS 1897, LIND 1913). Als taxonomisches Kriterium in systematischen Abhandlungen gewann aber auch die Befallsform nur eingeschränkt Bedeutung (JUEL 1912, DONK 1966), während lange Zeit anatomische Merkmale in den Mittelpunkt der Artbeschreibungen gestellt wurden (BURT 1915, SAVILE 1959a, MCNABB & TALBOT 1973). Die in dieser Arbeit mit molekularsystematischen Methoden gefundenen Gruppierungen von *Exobasidium*-Stämmen entsprechen weitgehend, aber nicht in allen Fällen, einem Artkonzept mit hoher Wirtsspezifität unter Berücksichtigung der ausgelösten Befallsbilder. Unterschiede zur Artauffassung bei NANNFELDT (1981) sind festzustellen, so bei den *Vaccinium vitis-idaea* parasitierenden Exobasidien und der Diversität europäischer *Rhododendron*-Parasiten. Experimentelle Erkenntnisse zur Wirtswahl der Exobasidien und zum Infektionsverlauf liegen nur in sehr begrenztem Umfang vor (RICHARDS 1896, HOTSON 1927, GRAAFLAND 1960, SUNDSTRÖM 1964, NICKERSON & VANDER KLOET 1997). Mit den hier gezeigten Schwierigkeit der Identifizierung kontaminierender Pilze (siehe Kapitel 4.1) ist auch nicht auszuschließen, daß uneindeutige Resultate solcher Experimente durch bisher nicht differenzierbare Kontaminationen verursacht sind. Die in der vorliegenden Untersuchung bearbeiteten Stämme (siehe Kapitel 2.1) stammen ebenso wie die den GENBANK-Einträgen zugrunde liegenden Stämme

(R. BAUER, pers.Mitt.) überwiegend aus Süddeutschland und dem Alpenraum. Die Artumgrenzungen in der Gattung *Exobasidium* werden nur über eine molekulare Bearbeitung von Pathogenen möglichst vieler Wirte und Befallsbilder, die auch das Verbreitungsgebiet der Gattung abdecken, umfassend zu charakterisieren sein. Vergleichende Sequenzanalysen mehrerer Gene („lineage sorting“) werden heute auch bei Pilzen zunehmend zur Abgrenzung von Arten auf phylogenetischer Grundlage eingesetzt (AVISE & WOLLENBERG 1997, KOUFOPANOU *et al.* 1997, TAYLOR *et al.* 2000, KROKEN & TAYLOR 2001, CRUSE *et al.* 2002) - ein für problematische Arten der Gattung *Exobasidium* vielversprechender Ansatz.

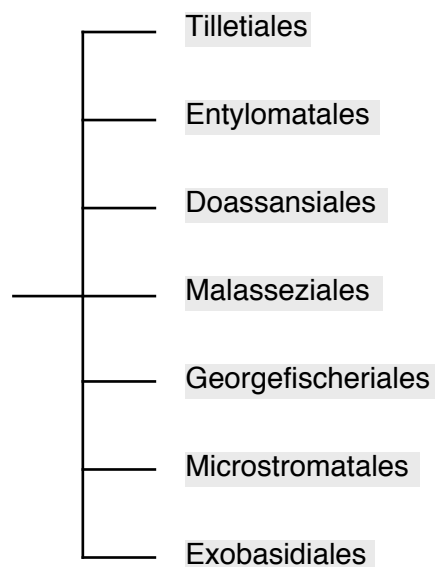
#### **4.4 Zur Phylogenie exobasidialer Pilze und zur Frage der Koevolution mit ihren Wirtspflanzen**

Die phylogenetischen Analysen der Sequenzen der Domäne I der 26S rDNA im Kontext der Ustilaginomycetes (siehe Abb.3.4-1 bis -4) bestätigen eine Stellung der Gattung *Exobasidium* in der Unterklasse Exobasidiomycetidae wie sie in anderen Untersuchungen mit demselben molekularen Marker gefunden worden ist (BEGEROW *et al.* 1997, BEGEROW 1998, FELL *et al.* 2000). Morphologisch-anatomische Ähnlichkeiten mit den Dacrymycetales (heute in der Klasse Hymenomycetes bzw. Basidiomycetes - SWANN & TAYLOR 1995a, 1995b, KIRK *et al.* 2001) wurden früher ebenso wie ultrastrukturelle Übereinstimmungen mit den Uredinales (heute in der Klasse der Urediniomycetes - SWANN & TAYLOR 1995a, SWANN & TAYLOR 1995b, KIRK *et al.* 2001) diskutiert (z.B. BLANZ 1978, OBERWINKLER 1978, KHAN *et al.* 1981, MIMS *et al.* 1987). Die phylogenetische Analysen von 26S rDNA Partialsequenzen zeigen keinerlei solche Verwandtschaftsbeziehungen. Jedoch bestätigten sie die früher schon mit biochemisch-physiologischen Merkmalen (LAASER 1989, DÖRFLER 1990, PRILLINGER *et al.* 1990b) und 5S rRNA-Sequenzen (WALKER & DOOLITTLE 1983, GOTTSCHALK & BLANZ 1985) hervorgehobene Nähe zu monokotylen Brandpilzen oder auch den Tilletiales. Die moderne Systematik der Brandpilze (Ustilaginomycetes) wurde neben molekularen Markern stark durch Vergleiche ultrastruktureller Merkmale geprägt (BAUER *et al.* 1997) und die Zugehörigkeit der Gattung *Exobasidium* zu diesem Verwandtschaftskreis ist heute unumstritten (BAUER *et al.* 2001b, FELL *et al.* 2001, KIRK *et al.* 2001). Hier erstmals analysierte Sequenzen der 18S rDNA von zwei *Exobasidium*-Arten (siehe Abb.3.5.3-1/-2) bestätigen dies Bild mit einem weiteren molekularen Marker.

#### **Die Ordnung der Exobasidiomycetidae - Schwestergruppenbeziehungen können mit 26S rDNA-Sequenzdaten nicht aufgelöst werden**

Bei den unterschiedlichen Verfahren zur Stammbaumrekonstruktion finden sich in den phylogenetischen Analysen der 26S rDNA-Partialsequenzen die sieben Ordnungen der Exobasi-

diomycetidae (BAUER *et al.* 2001b) als monophyletische Gruppen (siehe Abb.3.4-1 bis -4). Sie erhalten dabei i.d.R. eine hohe Unterstützung durch Jackknife- bzw. Wahrscheinlichkeitswerte. Jedoch werden die Beziehungen der Ordnungen zueinander je nach Analyseverfahren unterschiedlich wiedergegeben, und den entsprechenden basalen Teilen der Dendrogramme fehlt eine statistische Absicherung. Kollabiert man in diesen Dendrogrammen basale Äste ohne statistische Unterstützung, so ergibt sich jeweils dieselbe unaufgelöste Topologie (Abb.4.4-1), in der die Ordnungen der Exobasidiomycetidae gleichberechtigt nebeneinander stehen. Die Beziehungen der Ordnungen zueinander werden in Abhängigkeit von den jeweils analysierten Taxa und angewandten Analyseverfahren auch in anderen phylogenetischen Analysen von Sequenzen der Domäne I der 26S rDNA unterschiedlich aufgelöst. Dies zeigt sich bei einer vergleichenden Betrachtung von Analysen verwandtschaftlicher Beziehungen innerhalb der Ustilaginomycetes (BEGEROW 1998, BEGEROW *et al.* 2000, FELL *et al.* 2000), zur Klärung der phylogenetischen Position einzelner Taxa innerhalb der Exobasidiomycetidae (BAUER *et al.* 1999, BEGEROW *et al.* 2001) und auch zu den Beziehungen von Anamorph-Gruppen in diesem Verwandtschaftskreis (BOEKHOUT *et al.* 1995, SUGITA *et al.* 2003). Auch zeigen auf 26S rDNA-Datensätzen beruhende Analysen zur Phylogenie der Brandpilze mit einem größeren Umfang an Taxa z.T. erhebliche Unterschiede in den Beziehungen der Ordnungen in dieser Unterklasse zueinander (vergleiche z.B. BAUER *et al.* 2001b, FELL *et al.* 2001).



**Abb.4.4-1:** Die phylogenetischen Beziehungen der Ordnungen der Exobasidiomycetidae werden mit Sequenzen der Domäne I der 26S rDNA nicht aufgelöst. Consensus-Topologie für die in Abb.3.4-1 bis -4 gezeigten Dendrogramme: basale Äste ohne statistische Absicherung sind kollabiert und die Vertreter der Ordnungen zusammengefaßt (*Tilletiopsis albescens* und *T. pallescens* sind hier nicht berücksichtigt).

Bei Parsimony-Analysen ist neben der schlechten statistischen Absicherung auch ein niedriger Consistency-Index festzustellen, was einen hohen Gehalt an Homoplasien anzeigt. In der hier vorgestellten Parsimony-Analyse werden weniger als 40% der Daten der Matrix in dem sparsamsten Dendrogramm auch individuell optimal nach Parsimony-Kriterien wiedergegeben (CI = 38 bzw. 34%). Auch bei FELL *et al.* (2000) werden nur 36% erreicht. Und bei den Distanzanalysen treten hier im Neighbor-Joining-Verfahren sogenannte „ties“ auf, d.h. es existieren alternative Clusterwege. Auch ist in den Distanzanalysen auffällig, daß die basalen Äste ausgesprochen kurz sind, welche die einzelnen Ordnungen miteinander verknüpfen. Dies dürfte zu den unterschiedlichen Topologien der mit verschiedenen Distanzkoeffizienten erstellten Dendrogramme beitragen. Die Auswertung der 26S rDNA-Datensätze ist sehr sensitiv auf unterschiedliche Analysemethoden (siehe auch BEGEROW 1998, BAUER *et al.* 1999). Die unterschiedliche Handhabung uneindeutiger Alignmentbereiche, wie der hier und in anderen Arbeiten (BEGEROW *et al.* 2002a, BEGEROW *et al.* 2002b) vorgenommene Ausschluß selbiger, verstärkt diese Problematik. Ähnliches zeigt sich auch bei Untersuchungen anderer Pilzgruppen mit Sequenz der Domäne I der 26S rDNA auf ähnlichem systematischen Niveau, beispielsweise bei den Hymenomycten (WEIß & OBERWINKLER 2001).

Auch wenn mit Sequenzen der Domäne I der 26S rDNA die Beziehungen der Ordnungen der Exobasidiomycetidae zueinander nicht sicher aufgelöst werden, so liegt ein Vorteil dieses molekularen Markers in der mittlerweile großen Verfügbarkeit von Vergleichsdaten aus dem Verwandtschaftskreis der Brandpilze. Für die Klärung der Schwestergruppenbeziehungen sind weitergehende Analysen notwendig, aber eine Zuordnung zu den Ordnungen der Exobasidiomycetidae ist gut möglich. In der hier vorgestellten Distanzanalyse von 18S rDNA-Daten (siehe Abb.3.5.3-1), die in den Exobasidiomycetidae weitestgehend fehlen, sind die sehr ungleichen Distanzen zwischen den *Graphiola*-Arten im Vergleich zu denjenigen zwischen den beiden Exobasidien oder gar den beiden *Ustilago*-Arten auffallend. Dies läßt die Eignung der 18S rDNA als Marker in dieser Gruppe kritisch erscheinen. Neuere Analyseansätze versuchen jedoch einige der Probleme bei der Auswertung von rRNA-Daten zu reduzieren, wie beispielsweise ungleiche Substitutionsraten zwischen Sequenzpositionen (VAN DE PEER & DE WACHTER 1997, TOURASSE & GOUY 1999, VAN DE PEER *et al.* 2000) und auch der Einfluß kompensatorischer, nicht-unabhängiger Basenaustausche wird immer wieder diskutiert (WHEELER & HONEYCUTT 1988, DIXON & HILLIS 1993, TILLIER & COLLINS 1995, HANCOCK & VOGLER 2000). 18S rDNA-Analysen wurden in der Pilzsystematik gerade auch deshalb von 26S rDNA-Analysen abgelöst, weil interne bzw. basale Beziehungen zwischen höheren Taxa in auf 18S rDNA-Sequenzen beruhenden Dendrogrammen häufig ohne statistische Absicherung blieben, was sich auch in neueren Arbeiten immer wieder zeigt (GARGAS *et al.* 1995, SWANN & TAYLOR 1995a, SWANN *et al.* 1999, BERBEE *et al.* 2000, TEHLER *et al.* 2003). Zumindest innerhalb der Brandpilze scheint jedoch

die 26S rDNA alleine keine wesentlich bessere Absicherung zu bringen. Alternativ zur nukleären rDNA werden in jüngster Zeit proteinkodierende und auch mitochondriale ribosomale Gene analysiert. So wurde bei verschiedenen Pilzen gezeigt, daß das 16S rRNA-Gen der Mitochondrien langsamer evolviert als die 26S rDNA oder gar die ITS-Region der nukleären rDNA (MONCALVO *et al.* 2000, PRYOR & GILBERTSON 2000), aber schneller als die 18S rDNA (BRUNS & SZARO 1992). Allerdings weist dies Gen hypervariable Regionen auf, die selbst bei phylogenetischen Analysen nah verwandter Taxa nicht aligniert werden können (BRUNS & SZARO 1992, HIBBETT & DONOGHUE 1995, KO & JUNG 1999). Eine Vergleich von rRNA-Genen (16S, 18S, 23S und 26S rRNA) in einer umfassenden Analyse der Homobasidiomyceten gezeigt, daß je nach Gruppe eine unterschiedliche Genkombinationen eine bessere Unterstützung und Auflösung ergibt. Zwar liefert der Zusammenschluß aller vier Gene die besten Ergebnisse, ist aber ob der zu sequenzierenden Nukleotidmenge unpraktikabel (BINDER & HIBBETT 2002). Auch die Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Exobasidiomycetidae können wohl nur über die Gewinnung ergänzender Sequenzdaten besser aufgelöst werden. Unabhängig davon, ob die Domäne I der 26S rDNA als Marker eine nicht ideale Variabilität zeigt, oder ob sich die Gruppen der Exobasidiomycetidae zu schnell in zu kurzen Zeitabständen entwickelt haben (BAUER *et al.* 2001b), ein mehr an Daten sollte in Zukunft eine bessere Auflösung und Absicherung ermöglichen (siehe BERBEE & TAYLOR 2001).

Die Entylomatales und Georgerfischeriales bilden in den hier vorgestellten Analysen nie Schwestertaxa, womit die diesen beiden Ordnungen angehörenden *Tilletiopsis*-Arten phylogenetisch voneinander getrennt stehen. *T. albescens* und *T. pallescens* können hier genauso wenig wie bei BEGEROW *et al.* (2000) einer Ordnung sicher zugeordnet werden. *T. pallescens* zeigt allerdings hier Affinitäten zu den Microstromatales. Die Art gruppiert basal zu ihnen oder zu einer Gruppe aus Microstromatales und Exobasidiales. *T. albescens* weist gewisse Affinitäten zu den Doassansiales auf. Die Art gruppiert basal zu diesen oder sie bildet gemeinsam mit den Entylomatales das Schwestertaxon zu ihnen. Diese Affinitäten sind von den bei BEGEROW *et al.* (2000) für *T. pallescens* wiedergegebenen verschieden, welches dort eine basale Stellung zu allen Ordnungen der Exobasidiomycetidae einnimmt. *T. albescens* zeigt hingegen auch in anderen Analysen eine zumindest entfernte Beziehung zu den Doassansiales (BEGEROW *et al.* 2000, FELL *et al.* 2000). Auch bei Sequenzvergleichen der 18S rDNA von *Tilletiopsis*-Arten (TAKASHIMA & NAKASE 1996) ergab sich eine engere Beziehung zwischen den mittlerweile den Georgerfischeriales zugeordneten Arten *T. flava*, *T. fulvescens* und *T. minor*, die von den übrigen *Tilletiopsis*-Anamorphen abgesetzt sind. Da für die Analyse der 18S rDNA-Daten hier nur von Vertretern zweier anderer Ordnungen der Exobasidiomycetidae, von *Tilletia caries* (Tilletiales) und der Anamorphart *Sympodiomyces paphiopedili* (Microstromatales, siehe BEGEROW *et al.* 2001), Sequenzen verfügbar waren, sind Vergleiche mit den 26S rDNA-Ergebnissen nur begrenzt möglich.



Neben den Entylomatales und Georgerfischeriales umfassen die Tilletiales und Doassansiales Taxa, welche früher meist in den Ustilaginales bzw. Tilletiales geführt wurden (siehe z.B. OBERWINKLER 1982, HAWKSWORTH *et al.* 1995, BOEKHOUT *et al.* 1998). Die Doassansiales, Entylomatales und Georgerfischeriales wurden aufgrund ultrastruktureller Unterschiede, v.a. im Septenbau und im Interaktionsbereich, als eigenständige Ordnungen erst in neuerer Zeit beschrieben (BAUER *et al.* 1997). Die phylogenetischen Analysen bestätigen hier die Eigenständigkeit dieser Ordnungen, die i.d.R. eine gute statistische Absicherung erhalten. Es zeigt sich bei allen Analyseverfahren aber auch, daß sie keine monophyletische Gruppe bilden. Wie auch in einigen anderen Analysen (BAUER *et al.* 1999, BEGEROW *et al.* 2002b) nehmen die Tilletiales hier bei der Parsimony- und der Bayes'schen Analyse eine basale Stellung in den Exobasidiomycetidae ein.

Seit der Beschreibung der Malasseziales und ihrer Zuordnung in diesen Verwandtschaftskreis mit Partialsequenzen der 26S rDNA werden sieben Ordnungen in der Unterklasse Exobasidiomycetidae geführt (BEGEROW *et al.* 2000, BAUER *et al.* 2001b). Diese lipophilen, von Tieren und Menschen isolierten Hefen, die keine Pflanzenparasiten sind (GUILLOT & GUÉHO 1995), nehmen innerhalb der Exobasidiomycetidae aufgrund ihrer Lebensweise eine gesonderte Stellung ein. Ihre Zuordnung zu dieser Unterklasse ist daher auch nicht unumstritten, zumal eine unabhängige Analyse eines 26S rDNA-Datensatzes eine andere Auflösung der Beziehungen innerhalb der Ustilaginomyceten brachte und diese Gattung als eigenständige Linie neben Exobasidio- und Ustilaginomycetidae ansieht (FELL *et al.* 2000, FELL *et al.* 2001). Die hier vorgestellte 26S rDNA-Analyse mit Schwerpunkt auf *Exobasidium* spp. gruppiert die Malasseziales problemlos innerhalb der Exobasidiomycetidae, ebenso wie dies die phylogenetische Untersuchung von *Pseudozyma* spp. tut (SUGITA *et al.* 2003).

Die Microstromatales zeigen, wie schon erwähnt, zwar eine Affinität zu *T. pallescens*, aber in der Bayes'schen Analyse gruppieren sie als Schwestertaxa zu den Exobasidiales. *Microstroma* galt früher u.a. aufgrund der Lebensweise als ein möglicher nächster Verwandter von *Exobasidium* und wurde daher auch in die Familie bzw. Ordnung der Exobasidiaceae/Exobasidiales gestellt (HENNING 1900, BLANZ 1978, JÜLICH 1981). Schon mit der Analyse von 5S rRNA-Sequenzen, wo *Microstroma* in ein eigenes Cluster gestellt wird, wurde eine sehr nahe Beziehung zu *Exobasidium* widerlegt (GOTTSCHALK & BLANZ 1984). Und mit den 26S rDNA-Daten werden die Microstromatales, welche als Ordnung aufgrund ultrastruktureller Merkmale beschrieben worden war (BAUER *et al.* 1997), unabhängig von den Schwestergruppenbeziehungen, immer deutlich als eigenständige Linie, unabhängig von den Exobasidiales bestätigt. Auch zu den Cryptobasidiaceen, die heute ebenfalls in den Exobasidiales angesiedelt sind, zeigen die Microstromatales damit in den Sequenzvergleichen keine nähere verwandtschaftliche Beziehung, welche aufgrund der gastroiden Basidien angenommen worden war (OBERWINKLER 1978, 1982, BANDONI 1995).

Als Schwestergruppe der Exobasidiales stellen sich in der Bayes'schen Analyse die Microstromatales, in der Parsimony-Analyse jedoch die Entylomatales dar. Keine dieser Alternativen bestätigt sich in den Distanzanalysen, wo im Gegenteil die Exobasidiales als Schwertaxon zu allen übrigen Ordnungen und damit eher als basale Gruppe erscheinen. Damit werden hier mit den unterschiedlichen Analyseverfahren sehr verschiedene phylogenetische Hypothesen wiedergegeben. Aufgrund der Ausbildung eines Interaktionsbereiches mit Interaktionsappart werden nach ultrastrukturellen Untersuchungen die Exobasidiales mit den Entylomatales und Doassansiales in den Exobasidianaes zusammengefaßt (BAUER *et al.* 1997). Eine entsprechende Gruppierung wird hier in der Parsimony-Analyse gestützt.

### **Die Beziehungen in der Ordnung Exobasidiales werden je nach Analyseverfahren mit unterschiedlichen phylogenetischen Hypothesen wiedergegeben**

Innerhalb der Exobasidiales, werden heute vier Familien pflanzenparasitischer Pilze geführt (BAUER *et al.* 2001b, KIRK *et al.* 2001). Auch ihre Beziehung zueinander werden mit verschiedenen Analyseverfahren der 26S rDNA-Sequenzdaten in unterschiedlichen phylogenetischen Hypothesen wiedergegeben (Abb.4.4-2). Einige dieser Möglichkeiten lassen sogar die Familiengliederung fragwürdig erscheinen, da nur in den Distanzanalysen die Vertreter der Cryptobasidiaceae, Brachybasidiaceae und Graphiolaceae außerhalb der Exobasidiaceae clustern. Ebenso werden die Beziehungen der *Exobasidium*-Arten zueinander nicht einheitlich wiedergegeben. Die Gattung erscheint hier immer paraphyletisch, wenn man *Arcticomycetes* und *Muribasidiospora* als eigenständige Gattungen akzeptiert.

Eine unterschiedliche Darstellung der phylogenetischen Beziehungen innerhalb der Exobasidiales je nach Analyseverfahren ergibt sich auch in anderen, neueren Untersuchungen dieser Verwandtschaftsgruppe mit diesem Marker (BEGEROW 1998, BEGEROW *et al.* 2002a - Distanz-, Parsimony- und Maximum Likelihood-Verfahren). Auch zeigt sich in der Arbeit von BEGEROW (1998) dabei ein deutlicher Einfluß der Taxa-Auswahl, denn die Beziehungen innerhalb der Exobasidiales werden im Kontext unterschiedlicher Vergleichsdaten (Ustilaginomycetes, Exobasidiomycetidae bzw. Exobasidiales) verschieden aufgelöst. Parsimony-Analysen mit den beiden umfassenderen Datensätzen gruppieren die exobasidialen Taxa dort sogar polyphyletisch. Diese Effekte sind sicherlich nicht nur auf die zusätzlich enthaltenen Taxa (d.h. den Einfluß der Anzahl an Taxa auf Clusterwege oder den Gehalt an parsimony-informativen Merkmalen), sondern wohl vielmehr auf die bei verschiedenen Taxa resultierenden unterschiedlichen Alignments mit einer unterschiedlichen Verteilung von Gaps bzw. Indels zurückzuführen. So wurde in der vorliegenden Arbeit beispielsweise auf eine Auswertung der Sequenz von *Coniodictyum chevalieri* Har. & Pat. (AF487384) verzichtet, da diese Sequenz die Einführung vieler zusätzlicher Indel-Positionen in dem Alignment bewirkt hätte (Daten hier nicht gezeigt). Die auffallenden Sequenzunterschiede dieser Art resultieren

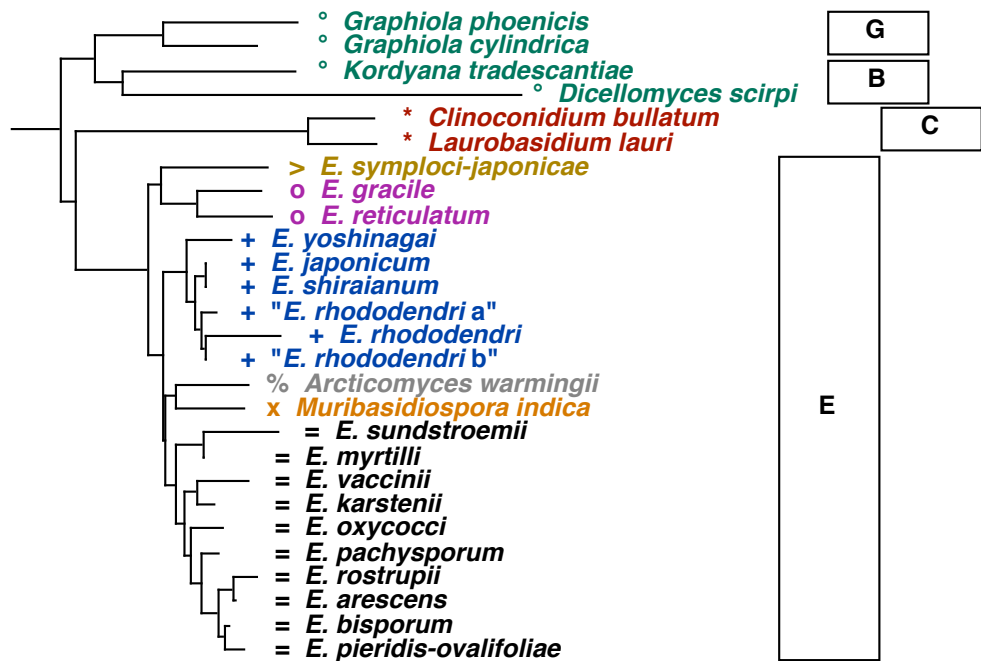
auch in einer großen Astlänge dieses Taxons in der Distanzanalyse bei BEGEROW *et al.* (2002a). In der vorliegenden Arbeit und bei BEGEROW *et al.* (2002a) sind problematische Alignmentbereiche von den phylogenetischen Analysen ausgeschlossen, während im Gegensatz dazu bei BEGEROW (1998) das gesamte Alignment verrechnet wurde, um den Informationsgehalt nicht zu verringern (zu dieser Problematik siehe auch GATESY *et al.* 1993). Die unterschiedliche Handhabung uneindeutiger Alignmentbereiche hat hier offenbar keinen starken Einfluß auf die Abhängigkeit der Dendrogramme von den jeweiligen Analyseverfahren. Ebenso wie in der Arbeit hier finden sich auch in den beiden gerade genannten keine statistischen Absicherungen für die Beziehungen innerhalb der Exobasidiales. Die gerade geschilderte Problematik verdeutlicht die Sensibilität mit welcher hier dieselben Daten auf Alignmentstrategien und Auswertverfahren reagieren. Auch wenn die 26S rDNA ein in der Pilzsystematik häufig eingesetzter Marker ist (siehe auch Einleitung), so zeigen die hier aufgezeigten Probleme doch, wie wichtig die Auswahl der angewandten Verfahren (siehe Kapitel 2.3.4) für die Ergebnisse und ihre detaillierte Angabe für eine Vergleichbarkeit ist.

Die Familie der Cryptobasidiaceae umfaßt die Gattungen *Botryoconis* Syd. & P.Syd., *Clinoconidium*, *Coniodictyum* Har. & Pat. und *Drepanoconis* J.Schröt. & Henn. (BAUER *et al.* 2001b, KIRK *et al.* 2001). Diese Pilze leben überwiegend auf Wirten aus der Familie der Lauraceae, nur *Coniodictyum chevalieri* tritt auf einer Rhamnaceen-Art (*Zizyphus macronata* Willd.) auf. Die Familie wurde von MALENÇON (1953) vorgeschlagen, wobei eine phylogenetische Nähe zu den Exobasidiaceen diskutiert wurde. Später wurde diese Gruppe teils als eine unabhängige Ordnung Cryptobasidiales angesehen (OBERWINKLER 1978, HAWKSWORTH *et al.* 1995). Neuerdings wird auch *Laurobasidium lauri* in dieser Familie geführt, die durch gastroide Basidien von den übrigen exobasidialen Familien unterschieden ist (BAUER *et al.* 2001b, BEGEROW *et al.* 2002a). Dieser Parasit von *Laurus canariensis* wurde ursprünglich als *Exobasidium*-Art beschrieben (GEYLER 1874) und erst 1982 in eine eigene Gattung gestellt (JÜLICH), die jedoch zunächst in den Exobasidiaceae/-ales verblieb (BANDONI 1995, HAWKSWORTH *et al.* 1995, BOEKHOUT *et al.* 1998, KIRK *et al.* 2001). Zwar zeigte die Zusammensetzung der Zellwandzucker im Vergleich zur Gattung *Exobasidium* relativ niedrige Glucose- und hohe Mannose-Anteile, widersprach aber einer verwandtschaftlichen Nähe nicht (PRILLINGER *et al.* 1993).

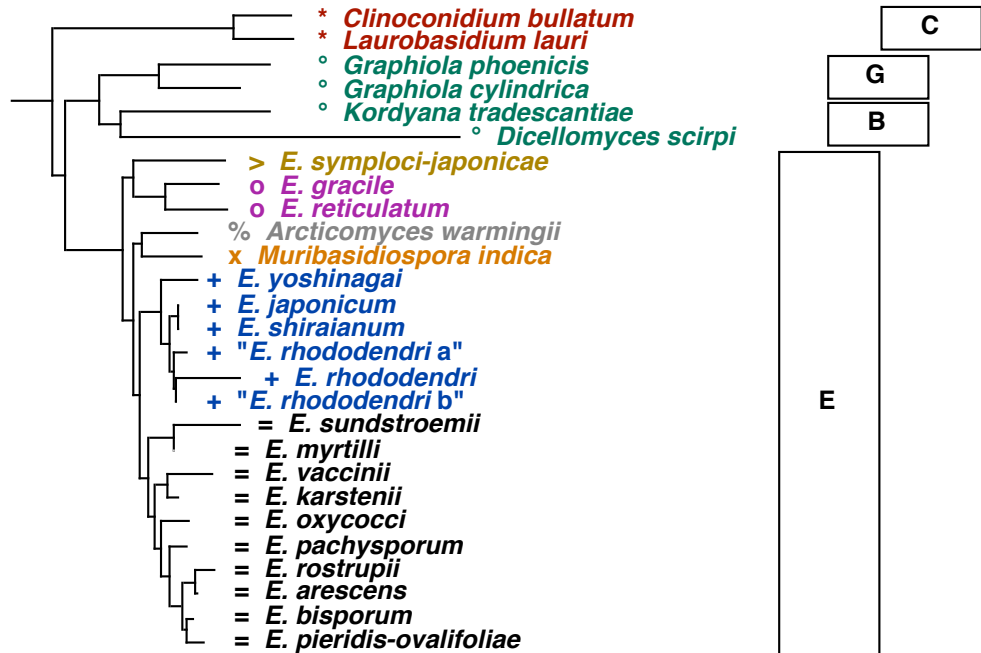
---

**Abb.4.4-2:** **Hypothesen zu den phylogenetischen Beziehungen innerhalb der Ordnung Exobasidiales.** Ausschnitte aus den Dendrogrammen der phylogenetischen Analyse der Sequenzdaten der Domäne I der 26S rDNA (Abb.3.4-1 bis -4). Die Familienzugehörigkeit der Pilze ist angegeben und die systematische Stellung der Wirtspflanzen ist farbig hervorgehoben. Die unterschiedlichen Analyseverfahren stellen die verwandtschaftlichen Beziehungen der Pilze und die Verhältnisse mit den Wirtspflanzen verschieden dar.

**A. Distanzanalyse nach Maximum Likelihood-Modell**



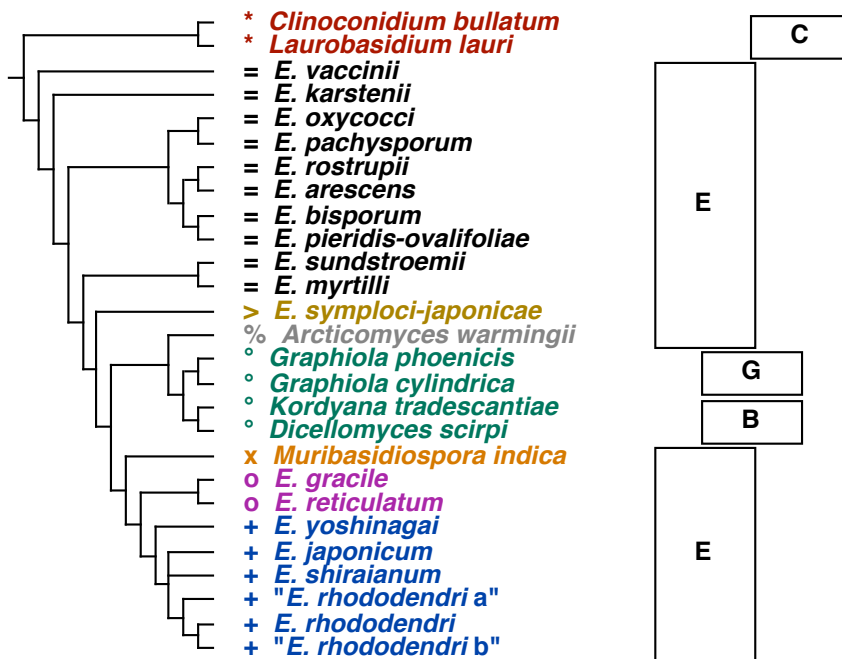
**B. Distanzanalyse nach Jukes/Cantor-Modell**



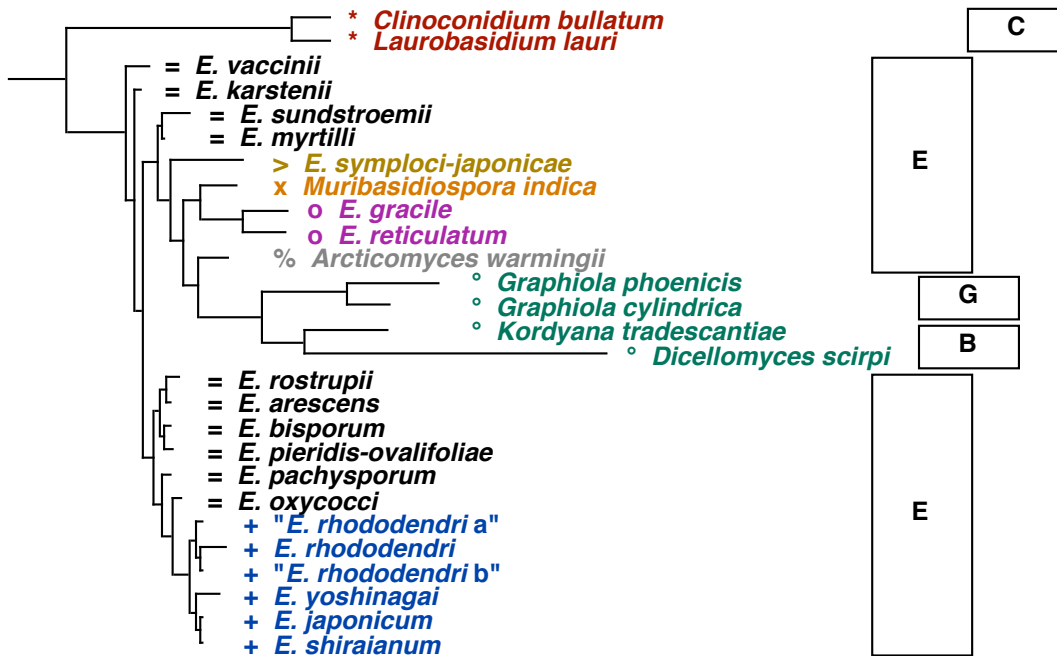
**Systematische Stellung der Wirtspflanzen**

- |             |                |                 |                 |
|-------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Lauraceae * | Commelinoids ◦ | Saxifragaceae % | Anacardiaceae x |
| Theaceae ◦  | Symplocaceae > | Vaccinioideae = | Rhododendron +  |

C. Marjority-Conensus der Parsimony-Analyse



D. Bayes'sche Analyse



Systematische Stellung der hier analysierten Pilze

- B = Brachybasidiaceae    C = Cryptobasidiaceae  
 E = Exobasidiaceae    G = Graphiolaceae

In den hier vorgestellten phylogenetischen Analysen der 26S rDNA-Partialsequenzen gruppiert *Laurobasidium lauri* eindeutig mit *Clinoconidium bullatum*, in allen vier Analysen mit Unterstützungswerten von 100%. Zugleich stellen sie meist die basale Linie innerhalb der Exobasidiales bzw. die Schwestergruppe zu allen anderen Gattungen dar. Lediglich in der Distanzanalyse nach dem Maximum Likelihood-Modell bilden sie das Schwestertaxa zu den Exobasidiaceen, während eine Gruppe aus Graphiolaceen und Brachybasidiaceen parallel dazu steht. Eine basale Stellung der Cryptobasidiaceae innerhalb der Exobasidiales zeigte auch die 26S rDNA-Sequenzanalyse von BEGEROW *et al.* (2002a), wo drei *Clinoconidium*-Arten, *Laurobasidium lauri* und *Coniodictyum chevalieri* diese Familie repräsentieren. Die Zuordnung von *Laurobasidium* zu den Cryptobasidiaceen wird bei einer anderen Taxa-Auswahl mit der hier vorgestellten Analyse unterstützt. In der ebenfalls auf 26S rDNA-Sequenzdaten beruhenden Parsimony-Analyse der Exobasidiales von BOEKHOUT *et al.* (2003), welche neu beschriebene, mit Milben assoziierte Hefen in diesen Verwandtschaftskreis pflanzenparasitischer Pilze einordnet, finden sich jedoch erstaunlicherweise Vertreter der Cryptobasidiaceae (*Coniodictyum chevalieri*, *Clinoconidium bullatum*) innerhalb der Exobasidiaceae wieder, was mit den hier vorliegenden Analysen nicht bestätigt werden kann.

Die Gattungen *Brachybasidium* Gäum., *Ceraceosorus* B.K.Bakash, *Dicellomyces*, *Exobasidiellum* Donk, *Kordyana* und *Proliferobasidium* J.L.Cunn. sind heute in der Familie der Brachybasidiaceae angesiedelt (KIRK *et al.* 2001), wobei die Zuordnung von *Ceraceosorus* strittig ist (BAUER *et al.* 2001b). Die Mitglieder dieser Familie parasitieren auf monokotylen Wirtspflanzen. Sie wurde von GÄUMANN (1926) für die Gattung *Brachybasidium* eingeführt, ohne dabei systematisch in die Nähe der Familie der Exobasidiaceae gesetzt zu werden, die in dem System von GÄUMANN in einer anderen Ordnung angesiedelt war und neben *Exobasidium* nur noch die Gattung *Kordyana* enthielt, welche lange in den Exobasidiaceen geführt wurde (GÄUMANN 1926, DONK 1956, SAVILE 1959a, McNABB & TALBOT 1973, HAWKSWORTH *et al.* 1995). Nachdem *Dicellomyces* schon in die Brachybasidiaceen gestellt worden war (McNABB & TALBOT 1973 - dort als Ordnung Brachybasidiales), umfaßte die Familie mit der Neubeschreibung und Eingliederung von *Ceraceosorus* und *Proliferobasidium* vier Gattungen und morphologische Ähnlichkeiten mit *Exobasidium* und *Kordyana* wurden nun diskutiert (CUNNINGHAM *et al.* 1976). Später wurden die Brachybasidiaceen gemeinsam mit den Exobasidiaceen in eine Ordnung gestellt, wobei die verdickten Probasidien der Brachybasidiaceen als Unterschied hervorgehoben sind (OBERWINKLER 1987, HAWKSWORTH *et al.* 1995, BOEKHOUT *et al.* 1998). Der Ausschluß von *Kordyana* aus den Exobasidiaceen und eine Zuordnung zu den Brachybasidiaceen wurde erst über Sequenzanalysen in neueren Untersuchungen gezeigt, womit der im Gegensatz zu den Exobasidiaceen adaxial gelegenen Hilaranhang der Basidiosporen als gemeinsames morphologisches Merkmal der Familie hervorgehoben wird (BAUER *et al.* 2001b, BEGEROW *et al.* 2002a).

In der vorliegenden Arbeit sind die Brachybasidiaceen in den Analysen der 26S rDNA-Partialsequenzen mit je einer Art der Gattungen *Dicellomyces* und *Kordyana* vertreten, die bei allen vier Analyseverfahren gemeinsam gruppieren, wenn sie auch nur in der Bayes'schen Analyse eine statistische Absicherung erhalten. Während sich bei BOEKHOUT *et al.* (2003) auch in der Parsimony-Analyse beide Gattungen gemeinsam mit einer der neu beschriebenen, Milben-assoziierten Hefen in einer monophyletischen Gruppe finden, zeigte sich in früheren Arbeiten, wo sie nur manchmal eine monophyletische Gruppe bildeten, eine Abhängigkeit von den Analyseverfahren und der Taxa-Auswahl (BEGEROW 1998, BEGEROW *et al.* 2002a). Bei den hier verrechneten Taxa bilden *Dicellomyces* und *Kordyana* unabhängig von den angewandten Analyseverfahren eine monophyletische Gruppe und die Stellung in einer Familie wird bestätigt.

Die Familie der Graphiolaceae beinhaltet heute die beiden Gattungen *Stylina* Syd. und *Graphiola*, die auf Palmen parasitieren (BAUER *et al.* 2001b, KIRK *et al.* 2001). Die systematische Stellung von *Graphiola phoenicis* war lange strittig. Nachdem sowohl Beziehungen zu den Rost- als auch Brandpilzen oder sogar die Zugehörigkeit zu Gruppen außerhalb der Basidiomyceten diskutiert wurden, schlug DONK (1973) eine eigene Ordnung für diese ungewöhnlichen Pilze vor. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden u.a. die karyologischen Verhältnisse und die Basidienstruktur aufgeklärt und die Eigenständigkeit der Graphiolales in den Basidiomyceten bestätigt (OBERWINKLER *et al.* 1982), die später allgemein Akzeptanz fand (BANDONI 1995, HAWKSWORTH *et al.* 1995). *Graphiola* bildet in einfachen Fruchtkörpern Basidien in Ketten, an denen seitlich Basidiosporen gebildet werden. Analysen von 5S rRNA-Sequenzen legten eine verwandtschaftliche Nähe zu *Exobasidium* nahe, denn beide Gattungen stehen nicht nur in einem Cluster, sondern haben sogar völlig übereinstimmende Sequenzen (GOTTSCHALK & BLANZ 1985). Bei BEGEROW (1998) und auch bei BEGEROW *et al.* (2002a) stellt *Graphiola* je nach Analyseverfahren entweder das Schwester-taxon zu den Brachybasidiaceen oder aber zu den Exobasidiaceen dar.

Die Graphiolaceen sind in den hier vorgestellten phylogenetischen Analysen ebenfalls durch zwei *Graphiola*-Arten repräsentiert. *G. cylindrica* und *G. phoenicis* gruppieren immer gemeinsam und bilden in den Analysen der 26S rDNA-Sequenzdaten immer die Schwestergruppe zu den Brachybasidiaceen, womit die beiden auf monokotylen Wirtspflanzen lebenden Familien der Exobasidiales eine monophyletische Gruppe bilden. Eine enge verwandtschaftliche Nähe zwischen *Graphiola* und den übrigen Exobasidiales, die aufgrund der bei ultrastrukturellen Untersuchungen gefundenen komplexen Interaktionsapparate mit Interaktionsring gefolgt worden war (BAUER *et al.* 1997), wird durch die Sequenzvergleiche der Domäne I der 26S rDNA bestätigt. Die hier vorgestellten Sequenzvergleiche zeigen eindeutig, daß die Graphiolaceen als Familie innerhalb der Exobasidiales anzusiedeln sind. Sie bilden keine eigenständige Ordnung, wie dies nach ersten Analysen von 26S rDNA-Daten noch

akzeptiert wurde, wo ansonsten nur *Exobasidium* spp. als Vertreter der Exobasidiales verrechnet wurden (BEGEROW *et al.* 1997). Auch eine basale Stellung als Schwestertaxon zu allen anderen exobasidialen Gattungen wie bei BOEKHOUT *et al.* (2003) findet hier mit keinem der Analyseverfahren eine Unterstützung. Während bei neueren 26S rDNA-Analysen von BEGEROW *et al.* (2000, 2002b), welche nur *Graphiola phoenicis* und *Exobasidium* spp. als Vertreter der Exobasidiales beinhalten, *G. phoenicis* durchaus das Schwestertaxon zu den Exobasidien bildet, gruppiert *G. phoenicis* bei einer vergleichbaren Taxa-Auswahl in der Parsimony-Analyse bei FELL *et al.* (2000) aber innerhalb der *Exobasidium*-Vertreter. Auch mit den hier analysierten Taxa findet sich in Parsimony- und Bayes'scher Analyse die monophyletische Gruppe aus Graphiolaceen und Brachybasidiaceen innerhalb der so paraphyletisch erscheinenden Exobasidiaceen, während die Distanzverfahren sie außerhalb dieser Familie ansiedeln. Die phylogenetische Stellung der Parasiten monokotyle Wirte im Verhältnis zu den übrigen exobasidialen Pilzen scheint mit 26S rDNA nicht aufgelöst zu werden.

Neben *Exobasidium* (inklusive *Arcticomyces*) werden in der Familie der Exobasidiaceae bei KIRK *et al.* (2001) die Gattungen *Endobasidium* Speshnew, *Laurobasidium* und *Muribasidiospora* geführt. Da *Laurobasidium*, wie oben erläutert, in die Cryptobasidiaceen transferiert wurde, ist bei BAUER *et al.* (2001b) in den Exobasidiaceen neben *Exobasidium* (ebenfalls inklusive *Arcticomyces*) nur noch *Muribasidiospora* akzeptiert. Über *Endobasidium*, dessen systematische Stellung als äußerst fraglich gilt (DONK 1956, SAVILE 1959b), gibt es keinerlei neuere Untersuchungen, die die Zugehörigkeit zu den Exobasidiaceen belegen würden. Während *Exobasidium*-Arten überwiegend Wirtspflanzen aus dem Verwandtschaftskreis der Ericales parasitieren, kommen die *Muribasidiospora*-Arten auf Anacardiaceen (*Rhus* spp.) und Ulmaceen (*Celtris tetrandra* Roxb.) vor, womit die Exobasidiaceen ausschließlich dikotyle Wirtspflanzen besiedeln. Gemeinsames Merkmal dieser Exobasidiaceen-Gattungen ist der typische exobasidiale Sporensatz an den Basidien mit dem abaxial liegenden Hilaranhang. Wie gerade geschildert gruppieren in den hier vorgestellten Analysen der 26S rDNA-Sequenzdaten die Graphiolaceen/Brachybasidiaceen bei einigen Analyseverfahren innerhalb der Exobasidiaceen. Auch in der Parsimony-Analyse von BOEKHOUT *et al.* (2003) sind die Exobasidiaceen paraphyletisch, wenn dies dort auch durch Vertreter der Cryptobasidiales verursacht wird. Von den hier vorgestellten, auf 26S rDNA-Sequenzdaten basierenden Dendrogrammen gruppieren nur die Distanzanalysen die Exobasidiaceae monophyletisch. Dies spiegelt die heute akzeptierte familiäre Aufgliederung der Exobasidiales wieder, die auch auf den genannten morphologisch-anatomischen Charakteristika der Basidien beruht (BAUER *et al.* 1998, BAUER *et al.* 2001b). Die 26S rDNA-Sequenzdaten stützen eine enge verwandtschaftliche Beziehung der Brachybasidiaceae zu den Graphiolaceae und die Cryptobasidiaceae erscheinen als basale Abzweigung innerhalb der Ordnung. Eine Auflösung und übereinstimmende Darstellung der genauen phylogenetischen



Stellung der Familien der Exobasidiales ist mit Sequenzdaten der Domäne I der 26S rDNA im Gegensatz zur systematischen Zuordnung von Gattungen zu einzelnen Familien anscheinend nicht zu erzielen.

### **Die Gattung *Exobasidium* - ein paraphyletische Gruppierung?**

Die Vertreter der Gattung *Exobasidium* selbst bilden in den hier vorgestellten 26S rDNA-Analysen im Kontext der Ustilaginomyceten nie eine monophyletische Gruppe. Selbst wenn man die gerade diskutierte Stellung der Familien der Graphiolaceen und Brachybasidiaceen außerhalb der Exobasidiaceae in den Distanzanalysen als phylogenetische Hypothese annimmt (siehe Abb.4.6-2A und B), so gruppieren doch immer die Vertreter der Gattungen *Arcticomyces* und *Muribasidiospora* zwischen den *Exobasidium* spp. und lassen diese paraphyletisch erscheinen.

SAVILE (1959b) begründet die Ausgliederung von *Exobasidium warmingii*, welches *Saxifraga* spp. befällt, in eine eigene Gattung *Arcticomyces* mit morphologisch-anatomischen Unterschieden. So bilde *A. warmingii* Basidien in Büscheln, ausgehend von Stromata, während bei *Exobasidium* die Basidien einzeln an nicht speziell differenzierten Hyphen entstehen. Diese Unterschiede wurden häufig nicht als ausreichend für eine Abtrennung betrachtet und die Eigenständigkeit der Gattung wurde schon bald angezweifelt (DONK 1966). Die von dem Spektrum der übrigen *Exobasidium* spp. abweichende Wirtsgattung wurde aber zusätzlich als Argument für die Beibehaltung einer eigenständigen Gattung gewertet und so wurde *Arcticomyces* von einigen Autoren anerkannt (RAJENDREN 1968, MCNABB & TALBOT 1973, JÜLICH 1982). Auch NANNFELDT (1981) behandelte diese Art auf *Saxifraga* nicht in seiner Bearbeitung der europäischen Exobasidien, während in jüngerer Zeit *Arcticomyces* auch wieder als Synonym in *Exobasidium* eingeordnet wird (HAWKSWORTH *et al.* 1995, BAUER *et al.* 2001b, KIRK *et al.* 2001). Die phylogenetische Stellung nach den hier vorgestellten 26S rDNA-Daten spricht gegen eine eigenständige Gattung *Arcticomyces*.

Die Gattung *Muribasidiospora* wurde für die neu entdeckte Art *M. indica* beschrieben (RAJENDREN 1968). Als Unterscheidungsmerkmal zu Exobasidien dienen auch hier in Büscheln gebildete Basidien und v.a. die mauerförmig septierten Sporen. Daher wurden von RAJENDREN gleichzeitig auch zwei frühere *Exobasidium* spp. in die neu aufgestellte Gattung transferiert, die im allgemeinen Anerkennung fand (MCNABB & TALBOT 1973, HAWKSWORTH *et al.* 1995, BAUER *et al.* 2001b, KIRK *et al.* 2001). Allerdings wurde später auch eine *Exobasidium*-Art auf *Camellia japonica* beschrieben, deren reife Basidiosporen ebenfalls als mauerförmig septiert dargestellt sind (*E. giganteum*, HIRATA 1981b Fig.2). Auch wurden Zweifel geäußert, da neben unseptierten Sporen auch transvers septierte Sporen und damit zwei verschiedene Sporentypen in der Gattung *Exobasidium* auftreten (DONK 1974). In den

hier vorgestellten Analysen im Kontext der Ustilaginomyceten ist die Gattung *Muribasidiospora* durch ihre Typusart vertreten. Die Eigenständigkeit der Gattung *Muribasidiospora* gegenüber allen übrigen *Exobasidium*-Arten wird durch die 26S rDNA-Daten nicht gestützt.

Mit keinem der Analyseverfahren bilden die *Exobasidium* spp. eine geschlossene, monophyletische Gruppe. Hierfür gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Aufgrund der geringen Artenzahl in den Gattungen *Arcticomyces* (1) und *Muribasidiospora* (3) ist bei Stammbaumrekonstruktionen ein Ungleichgewicht zwischen der Anzahl verrechneter Arten der einzelnen Gattungen der Exobasidiaceae nicht zu vermeiden. Eine zahlenmäßig ungleiche Repräsentation wird hier nicht nur durch eine subjektive Taxa-Auswahl hervorgerufen. Die Auswahl der Taxa hat aber ebenso wie die Überrepräsentation einzelner Gruppen Einfluß auf die Stammbaumrekonstruktion (HILLIS 1998, PURVIS & AGAPOW 2002). Wenn man die Phylogenie der *Exobasidium*-Arten in umfassenderen Analysen untersuchen möchte, läßt sich dies Problem nicht vermeiden. In einer Studie über die Gattung *Muribasidiospora* von BEGEROW *et al.* (2001) gruppiert *M. indica* in molekularen Analysen als Schwestertaxon zu den *Exobasidium*-Arten, von denen aber auch nur drei in der Analyse verrechnet sind. Hingegen sind auch in dem mehr Arten umfassenden Sequenzvergleich bei BEGEROW *et al.* (2002a) die Verhältnisse nicht eindeutig und in Abhängigkeit vom Analyseverfahren verschieden. Dort gruppiert *M. indica* in der Distanzanalyse ebenfalls innerhalb von *Exobasidium*.

Die hier gefundene phylogenetischen Beziehungen zeigen an, daß Merkmale wie die Sporensptierung und Aggregation von Basidien in Büscheln alleine keine guten Merkmale zur Trennung von Gattungen innerhalb der Exobasidiaceen sind. Die Gattung *Exobasidium* weist jedoch hohe Unterschiede im GC-Gehalt der DNA zwischen einzelnen Arten auf (BLANZ & OBERWINKLER 1983, siehe Anhang III). Auch wenn für „*E. vexans*“ und die GC-Wert-Gruppen 1 und 5 nachgewiesen ist, daß es sich um kontaminierende Pilze handelte (siehe Kapitel 4.1) und die entsprechenden Stämme bei Bewertungen der GC-Werte innerhalb der Gattung *Exobasidium* nicht mehr berücksichtigt werden, so verbleibt doch im GC-Gehalt mit 13% eine ungewöhnlich hohe Spannbreite. Unterschiede im GC-Gehalt von über 10% werden vielfach als Indiz für die Heterogenität einer Gattung betrachtet (NAKASE & KOMAGATA 1971, KURTZMAN 1998). Auch wird das Auftreten unterschiedlicher Typen des Ubichinons Coenzym Q so interpretiert (BOEKHOUT *et al.* 1993). Bei *Exobasidium*-Stämmen sind zwei Typen nachgewiesen, das Q9- und das Q10-System, wobei sich zwei Stämme von *Rhododendron* spp. von den übrigen untersuchten Exobasidien unterscheiden (YAMADA *et al.* 1987). Trotz solcher molekularsystematischen Befunde wurde eine kongenerische Stellung der gerade auch auf europäischen Ericaceen parasitierenden *Exobasidium*-Arten nie angezweifelt, da ihre Lebensweise und ihre mikroskopischen Merkmale zu einheitlich erschienen. Bei den untersuchten *Exobasidium*-Arten ist keine Korrelation der Höhe des GC-Gehalts mit den Wirtspflanzen oder der phylogenetischen Stellung der Arten offensichtlich. Elektronen-

mikroskopische Untersuchungen haben jedoch jüngst gezeigt, daß der Interaktionsbereich zwischen Pilz und Wirt je nach Art unterschiedlich lokalisiert sein kann - in speziellen Haustorien oder einfach in interzellularen Hyphen - und so weitere Merkmalskomplexe erschlossen werden können (BAUER *et al.* 1997). Mit den Ergebnissen der vorliegenden Sequenzanalysen bieten gezielte Untersuchungen nun die Möglichkeit relevante morphologisch-anatomische Unterschiede zu finden und zu einer besseren Umgrenzung der Gattung *Exobasidium* zu gelangen. Hierbei spielen sicherlich auch die Wirtspflanzen, auf die im folgenden noch eingegangen wird, eine Rolle. Die vorliegenden Daten legen im Moment eine weit gefaßte Gattung *Exobasidium* nahe, da die heute normalerweise der Gattung zugerechneten Arten keine monophyletische Gruppe bilden. Für eine eventuelle Aufgliederung und sinnvolle Abgrenzung sind weitere Untersuchungen notwendig.

### **Die Evolution der Gattung *Exobasidium* und die Beziehung zu ihren Wirtspflanzen**

Die Wirtsspezifität der *Exobasidium*-Arten wird im Zusammenhang mit dem Artkonzept schon länger diskutiert (siehe auch Kapitel 4.3). Jedoch finden sich kaum Überlegungen zur Evolution dieser Pflanzenparasiten und der Rolle die ihre Wirtspflanzen dabei spielen. Dies steht im Gegensatz zu anderen Gruppen obligater Pflanzenparasiten, wo diese Aspekte früh ausführlich erörtert wurden, insbesondere bei Rostpilzen, aber auch bei den Brand- und den Mehltaupilzen (z.B. LEPPIK 1955, SAVILE 1961, KUKKONEN & TIMONEN 1979, SAVILE 1979, VÁNKY 1979, HIJWEGEN 1988). Ähnliches gilt auch für andere Bereiche der Interaktion zwischen Pilz und Wirt, wie beispielsweise der Evolution der von Exobasidien ausgelösten, unterschiedlichen Befallsbilder. Dies liegt sicherlich daran, daß solche Fragen erst mit dem relativ eng gefaßten Artkonzept von NANNFELDT (1981) für die Gattung *Exobasidium* relevant wurden. NANNFELDT selbst äußert die Vorstellung, daß die in den Wirtspflanzen überdauernden, systemisch infizierenden Parasiten die weiter entwickelten Formen mit einer besseren Anpassung an ihre Wirte darstellen. Zuvor hatte SAVILE (1959a) eine Vorstellung zur Phylogenie der Gattung geäußert. Da sein Artkonzept für die nordamerikanischen Exobasidien aber anatomische Merkmale wie die Sporengröße betont und den Wirten sowie Befallsbildern keine große Bedeutung zuerkennt, ist ein Vergleich nur schwer möglich. Aber bei der Umgrenzung natürlicher Einheiten in den Exobasidiomycetidae 1997 (BAUER *et al.*) fanden die Beziehungen zu den Wirtspflanzen Berücksichtigung und sie spiegeln sich auch in molekularen Phylogenien wieder (u.a. BAUER *et al.* 1999, BAUER *et al.* 2001a, BEGEROW *et al.* 2001). BEGEROW *et al.* (2002a) stellten jüngst eine erste molekulare Analyse zur Evolution exobasidialer Pilze vor, die mit den Ergebnissen der hier erarbeiteten phylogenetischen Hypothesen verglichen werden soll.

Konzepte und Aspekte der Evolution obligater, spezialisierter Parasiten und ihrer Wirte - besonders im Hinblick auf Pilze - werden bei PARLEVLIET (1986) und HIJWEGEN

(1988) erörtert. Dabei werden zwei prinzipiell unterschiedliche Phänomene in der Evolution solcher Pilze aufgezeigt. Zum einem ist dies die Spezialisierung eines Parasiten auf verschiedene Wirte, wobei die Evolution der Parasiten entweder derjenigen der Wirte folgt (Kospeziation) oder aber eine wechselseitige Beeinflussung stattfindet (Koevolution). Zum anderen ist es der Wirtswechsel („host jumping“ oder „host switch“), der Abweichungen von den ansonsten vorhandenen Wirt-Parasit-Assoziationen in einem Verwandtschaftskreis und das Auftreten von Parasiten auf nicht näher verwandten Wirten erklärt. Solche evolutiven Vorgänge führen zu unterschiedlichen Effekten beim Vergleich der Phylogenien von Parasiten und ihren Wirt. Im ersten Fall stimmen sie überein, während sich in letzterem Widersprüche ergeben („association by descent“ versus „association by colonization“ im Sinne von BROOKS 1988).

Die hier vorgestellten phylogenetischen Hypothesen zur Evolution der exobasidialen Pilze können mit den heutigen Erkenntnissen zur Phylogenie ihrer Wirte in Bezug gesetzt werden. Auch die Systematik der höheren Pflanzen hat sich in den letzten Jahren durch molekularsystematische und phylogenetische Untersuchungen verändert. 1998 (APG) erschien eine zusammenfassende großsystematische Gliederung der Angiospermen, die auf den Analysen mehrerer molekularer Marker aufbaut (KÄLLERSJÖ *et al.* 1998, SOLTIS *et al.* 2000). Für die Wirtspflanzen der Exobasidiales ergibt sich hieraus ein teilweise verändertes Bild gegenüber früheren systematischen Gliederungen. Die Familien der Exobasidiales und ihre Beziehungen zueinander, wie sie sich hier in den Distanzanalysen darstellen (siehe Abb.4.4-2A und B), korrespondieren mit diesen, wie auch schon die Analysen von BEGEROW *et al.* (2002a) gezeigt haben. So bilden die Lauraceae (Laurales), neben einigen wenigen anderen dikotylen Pflanzen die Wirte der meisten Cryptobasidiaceen, eine eigenständige phylogenetische Linie neben den zwei Hauptgruppen der Angiospermen, den Monocots bzw. Eudicots. Dies entspricht der basalen Stellung der Cryptobasidiaceen innerhalb der Exobasidiales. Innerhalb der Monocots finden sich die Familien mit Wirtspflanzen der Graphiolaceen und Brachybasidiaceen zwar in verschiedenen Ordnungen, diese sind jedoch monophyletisch in der Gruppe der Commelinoids vereint. Dies entspricht der Gruppierung dieser beiden exobasidialen Familien als Schwestertaxa. Hingegen sind alle Wirte der Exobasidiaceae in der Kerngruppe der Eudicots angesiedelt. Die Saxifragaceae (Saxifragales), den Wirt von *Arctomyces* beinhaltend, bilden eine eigenständige Linie neben den beiden Gruppen der Rosids und Asterids. Innerhalb der Rosales (Eurosids I) finden sich die Ulmaceae und innerhalb der Sapindales (Eurosids II) die Anacardiaceae, womit die Wirte der *Muribasidiospora*-Arten sich auf verschiedene Gruppen der Eurosids verteilen. Die Wirte von *Exobasidium* selbst werden heute in einer einzigen Ordnung geführt, da die Theales als Synonym der Ericales gelten. Die Ericales bilden innerhalb der Asterids neben den beiden Gruppen der Euasterids eine eigenständige Linie. Aufgrund dieser Verteilung der systematischen Zugehörigkeit der

Wirtspflanzen und einer Besiedlung von Wirten über das gesamte Spektrum der Angiospermen kann man davon ausgehen, daß die Vorfahren der Exobasidiales als Parasiten schon in der frühen Evolution der Angiospermen auftraten.

Allerdings muß erwähnt werden, daß bei hier nicht analysierten Arten auch Abweichungen von diesen systematischen Assoziationen zwischen Pilzen und Wirten festzustellen ist. So befinden sich die Rhamnaceae ebenso wie die Ulmaceae in den Rosales, womit der Wirt von *Coniodictyum chevalieri*, einer Cryptobasidiaceen-Art, in derselben Ordnung angesiedelt ist wie Wirte von *Muribasidiospora*-Arten, aber nicht in der Nähe der Laurales. Und die Wirte der *Muribasidiospora* spp. selbst verteilen sich, wie gerade erwähnt, auf zwei nah, aber nicht nächst verwandte Ordnungen der Rosids. Dies gibt Anlaß die systematische Zuordnung dieser Pilze kritisch zu hinterfragen, denn hier erfolgte offensichtlich keine Kospeziation/Koevolution mit den Wirten. Für diese Verteilung müßte ein Wirtswechsel auf ein entfernt verwandtes Wirtstaxon stattgefunden haben. Während *Coniodictyum* in der Arbeit von BEGEROW *et al.* (2002a) als Schwestertaxon zu Cryptobasidiaceen-Arten auf Lauraceen erscheint, wurde *Muribasidiospora celtidis* (T.S.Ramakr. & K.Ramakr.) Kamat & Rajendren bisher nicht untersucht. Wirtswechsel in der Evolution pflanzenpathogener Pilze sind mit phylogenetischen Analysen heute relativ sicher belegt. Bei *Puccinia* spp. auf Brassicaceen werden in der Evolution Wirtswechsel eher zwischen räumlich verfügbaren denn nah verwandten Wirtsarten dieser Rostpilze angenommen (ROY 2001). Auch bei Mehлтаupilzen der Gattung *Golovinomyces* (U.Braun) V.P.Gelyuta wird gefolgert, daß auf eine Phase der Kospeziation/Koevolution eine Phase mit Wirtswechseln zwischen Wirten verschiedener Angiospermenfamilien folgte (MATSUDA & TAKAMATSU 2003). In der Gattung *Entyloma* scheinen hingegen innerhalb der beiden Hauptgruppen der Wirte (Asteridae bzw. Ranunculales) vorrangig Kospeziations-/Koevolutionsmechanismen eine Rolle gespielt zu haben (BEGEROW *et al.* 2002b).

Selbst innerhalb der Exobasidiaceen spiegeln die Gruppierungen in den hier vorgestellten phylogenetischen Hypothesen die verwandtschaftlichen Beziehungen der Wirtsgattungen zum Teil wieder. So gruppieren die beiden Wirte der Theaceae parasitierenden Arten immer gemeinsam. Auch die *Rhododendron*-Parasiten bilden eine monophyletische Gruppe, wobei die Exobasidien von europäischen Wirten in einem *E. rhododendri*-Komplex clustern. Nur bei den *Exobasidium* spp. von Wirten der Vaccinioideae ergibt sich in der Bayes'schen Analyse eine Aufteilung auf zwei Gruppen und in der Parsimony-Analyse sogar eine paraphyletische Verteilung basal zu allen übrigen Arten. Bei keinem der Analyseverfahren finden sich die *Vaccinium*-Parasiten in einer monophyletischen Gruppe. Dies ist auch in den Parsimony-Analysen von BEGEROW *et al.* (2002a) und BOEKHOUT *et al.* (2003) der Fall. Da nach jüngsten phylogenetischen Untersuchungen jedoch die Gattung *Vaccinium* auch keine monophyletische Gruppe darstellt (KRON *et al.* 2002), wäre es wohl notwendig die

Phylogenie der entsprechenden Wirtstaxa zu untersuchen, um zu genaueren Aussagen über Kospeziations-/Koevolutionsereignisse zu gelangen. Nur in der Distanzanalyse nach dem Jukes/Cantor-Modell (siehe Abb.4.6-2B) bilden die Exobasidien von Wirten der Ericaceae eine monophyletische Gruppe. In Zusammenschau mit den besprochenen Vorstellungen zur familiären Aufgliederung der Exobasidiales und der systematischen Zugehörigkeit der Wirtspflanzen stellt dieses Dendrogramm wohl eine gute Hypothese zur Phylogenie der exobasidialen Pilze dar. Folgt man dem Konzept der Kospeziation oder Koevolution, also einer „association by descent“, so sollte der gemeinsame Vorfahre der Exobasidiaceen auf einem ursprünglichen Vertreter aus der Kerngruppe der Eudicots gelebt haben.

Abschließend ist festzustellen, daß in den Analysen hier, ebenso wie bei BEGEROW *et al.* (2002a), die von einer Wirtsart der Vaccinioideae stammenden, unterschiedliche Befallsbilder hervorrufenden Exobasidien nicht gemeinsam gruppieren, sondern voneinander getrennt stehen: *E. karstenii* / *E. sundstroemii* auf *A. polifolia*, *E. oxycocci* / *E. rostrupii* auf *V. oxycoccos* und *V. macrocarpum*, *E. arescens* / *E. myrtilli* auf *V. myrtilillus*. Bei der Artbildung der Exobasidien scheinen daher neben den Wirtspflanzen auch die Befallsformen eine Rolle gespielt zu haben. Die Evolution der Gattung stellt ein Wechselspiel zwischen den beiden Faktoren „Wirtswahl“ und „Infektionsform“ dar, das mit den evolutiven Vorgängen der „association by descent“ und „association by colonization“ erklärt werden kann. Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang *E. vaccinii*, die Typusart der Gattung. Denn mit der in der vorliegenden Arbeit gefundenen Umschreibung mit verschiedenen Befallsformen (siehe Kapitel 4.3.1) könnte sie ein besonderes Potential für die Entwicklung spezialisierter Arten enthalten. Zusätzlich scheinen aber auch innerhalb der *Rhododendron*-Parasiten kryptische Arten aufzutreten (siehe Kapitel 4.3.2). Dies setzt die Differenzierung auf einer einzigen Wirtsart ohne eine Änderung der Befallsform voraus und läßt sich nur mit einem weiteren Phänomen in der Evolution der Exobasidien erklären, nämlich einer „within host speciation“ (oder „duplication“ im Sinne von PAGE & CHARLESTON 1998). Die Evolution der Gattung *Exobasidium* ist somit sehr komplex verlaufen. Die Analyse eines möglichst umfassenden Artenspektrums, daß auch eine Bearbeitung von zusätzlichen Wirtsgruppen wie den Epacridaceen (MCNABB 1962) oder amerikanischen Gattungen der Ericaceae (BURT 1915, SAVILE 1959a, GÓMEZ & KISIMOVA-HOROVITZ 1998) einschließt, dürfte in Zukunft weiteres Interessantes zur Phylogenie dieser Pflanzenparasiten erbringen. Da von solchen Exobasidien früher keine Kulturen verfügbar waren, wurden sie bisher nicht mit molekularen Markern untersucht. Mit den nun vorliegenden Sequenzinformationen sollte zukünftig aber auch ein direkter Zugang über pilzspezifische PCR-Amplifikationen möglich sein.

## 5 Zusammenfassung

Phylogenie und Artabgrenzungen in der pflanzenparasitischen Pilzgattung *Exobasidium* wurden mit molekularen Merkmalen untersucht. Das allgemein akzeptierte Artkonzept für die europäischen Arten der Gattung basiert auf Wirtsspezifität und den hervorgerufenen Befallsbildern. Vergleiche der Basenzusammensetzung der DNA und DNA-DNA-Homologien in ersten molekularen Studien bestätigten dies nicht in allen Fällen. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit mit modernen Methoden der Molekularsystematik Artabgrenzungen im Kontext phylogenetischer Zusammenhänge untersucht. Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen und DNA-Sequenzdaten wurden hierzu verwendet und der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf Pilzstämmen, die von europäischen Wirtsarten der Gattungen *Vaccinium* und *Rhododendron* stammen. Hefeartig wachsende Kulturen der saprotrophen Lebensphase dieser Parasiten aus verschiedenen Stammsammlungen wurden bearbeitet, insgesamt 51 Stämme. Für einige dieser Stämme lagen aus früheren Untersuchungen Angaben zum GC-Gehalt oder auch zu DNA-DNA-Homologien vor, die vergleichend genutzt werden konnten. Die Stämme stammen von folgenden Wirtsarten: *Andromeda polifolia*, *Menziesia ferruginea*, *Rhododendron degronianum*, *Rh. ferrugineum*, *Rh. hirsutum*, *Rh. indicum*, *Rh. x intermedium*, *Thea sinensis*, *Vaccinium macrocarpum*, *V. myrtillus*, *V. oxycoccos*, *V. uliginosum*, *V. vitis-idaea*.

Für eine molekulare Charakterisierung der Stämme wurden mit fünf Restriktionsenzymen Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen eines mittels PCR amplifizierten Abschnittes des 26S rRNA-Gens ermittelt (PCR-RFLPs). Der amplifizierte 5'-Bereich kodiert für einen rund 2.2 kb großen Abschnitt der 26S rRNA. Stämme mit übereinstimmenden RFLP-Mustern wurden in Gruppen zusammengefaßt, wozu eine Auswertung der PCR-RFLP-Bilder mit Hilfe spezieller Bildanalysesoftware erfolgte, die auch densitometrische Messungen ermöglichte. Zur Darstellung der Ähnlichkeiten dieser RFLP-Muster wurden ausgehend von einer 0/1-Matrix Dendrogramme erstellt. Insgesamt werden 20 Gruppen mit unterschiedlichen RFLP-Mustern nachgewiesen, wobei die Übereinstimmung in den RFLP-Mustern des 5'-Bereichs der 26S rDNA Konspezifität anzeigt, da Stämme mit übereinstimmendem RFLP-Muster einen ähnlichen GC-Gehalt haben und hohe DNA-DNA-Homologien aufweisen. Jedoch finden sich auch Stämme mit hoher DNA-DNA-Homologie oder solche von einer Wirtspflanze ('Einsporkulturen') in verschiedenen RFLP-Gruppen. Zusätzlich zeigen die Dendrogramme zwischen einzelnen RFLP-Gruppen auffallend ungleich große Distanzen. Eine nachfolgende Analyse der Sequenzen der Domäne I der 26S rDNA bestätigte, daß Stämme einer RFLP-Gruppe Angehörige einer Pilzart sind, daß aber Stämme einer Art durchaus unterschiedlichen RFLP-Gruppen angehören können. Unterschiede in den RFLP-Mustern der analysierten Genregion können daher Konspezifität nicht widerlegen.

Für die unerwarteten Ergebnisse der PCR-RFLP-Analysen ließen sich zwei Gründe feststellen. Erstens kann die amplifizierte Region des 26S rRNA-Gens Insertionen enthalten, deren Auftreten nicht artspezifisch ist. Zweitens gruppieren einige der untersuchten Stämme in phylogenetischen Analysen in anderen Verwandtschaftskreisen der Ustilaginomyceten, wodurch sie als kontaminierende Pilze identifiziert werden.

Die Insertionen, die typische Charakteristika von Group-I-Introns aufweisen, liegen an Position 929/930 bzw. 1.127/1.128 der 26S rDNA (bezogen auf *Saccharomyces cerevisiae*). Die PCR-Produkte der *Exobasidium*-Stämme bilden fünf Größenklassen (2.2, 2.5, 2.6, 2.8 und 2.9 kb), während diejenigen der als Kontaminationen identifizierten Stämme intron-frei sind. Die vier verschiedenen Größen intron-haltiger PCR-Produkte bei nur zwei Insertionsorten erklären sich durch unterschiedliche Introns an einer Insertionsstelle und eine Kombination von Introns an beiden Insertionsstellen. An Position 929/930 kann ein Intron von ca. 300 bp oder von ca. 400 bp Länge vorhanden sein oder an Position 1.127/1.128 ein Intron von ca. 600 bp Länge. Die Kombination eines ca. 300 bp großen Introns an der vorderen mit einem ca. 400 bp großen Intron an der hinteren Insertionsstelle erklärt die größte PCR-Produktgrößenklasse. Die Verteilung der Group-I-Introns zwischen Stämmen, welche aufgrund hoher Übereinstimmungen in den für die Domäne I der 26S rRNA kodierenden Bereichen und ihrer nachgewiesenen DNA-DNA-Homologie als konspezifisch anzusehen sind, zeigt, daß das Auftreten von Group-I-Introns innerhalb der *Exobasidium* spp. nicht artspezifisch ist.

Für phylogenetische Analysen wurden die Sequenzen der Domäne I der 26S rDNA ausgewählter Stämme untereinander und mit Sequenzen aus GENBANK verglichen, die noch zusätzliche Wirtsarten repräsentieren (*Eubotryoides grayana*, *Lyonia neziki*, *Symplocus* spec.). 46 Sequenzen wurden über 599 homologe Nukleotidpositionen aligniert. Bei Berücksichtigung der verfügbaren Daten zu DNA-DNA-Homologien kann beim Auftreten von weniger als drei Basenpaaren Unterschied in der Domäne I der 26S rDNA Konspezifität festgestellt werden. Durch diesen Vergleich werden auch Stämme, die vor Einführung des z.Z. akzeptierten Artkonzeptes isoliert worden waren, den jeweils entsprechenden Arten zugeordnet.

Die Mitglieder dreier RFLP-Gruppen zeigen auffallende Sequenzunterschiede zu allen anderen Stämmen im Bereich der Domäne I der 26S rDNA und Datenbankvergleiche ergaben Affinitäten zu den Entylomatales bzw. Ustilaginales. Die phylogenetische Analyse der Partialsequenzen der 26S rDNA im Kontext der Ustilaginomyceten bestätigt dies ebenso wie Sequenzanalysen der 18S rDNA und ITS-Region ausgewählter Stämme. Stamm RBF 726 gruppiert gemeinsam mit Vertretern der Ustilaginales (u.a. *Ustilago maydis* und der anamorphen Hefe *Pseudozyma antarctica*). Die Stämme PB 2857e und PB 4898-9 gruppieren hingegen mit *Entyloma* spp. (Entylomatales). Die Stämme PB 383, PB 393 und



PB 3276 zeigen hohe Affinitäten zu *Tilletiopsis washingtonensis* (Entylomatales) und können mit dieser anamorphen Hefe konspezifisch sein. Diese hier als kontaminierende Pilze nachgewiesenen Stämme, die mit biochemischen oder physiologischen Merkmalen früher nicht von *Exobasidium*-Stämmen zu differenzieren waren, stammen von verschiedenen Wirtspflanzen und hatten damit früher einem auf hoher Wirtsspezifität basierenden Artkonzept widersprochen.

Mit verschiedenen molekularen Merkmalen und ihrer Gruppierung in phylogenetischen Analysen wird hier Konspezifität zwischen *Exobasidium*-Stämmen nachgewiesen. *Exobasidium* spp. korrespondieren dabei gut mit den Wirtspflanzen, d.h. sie zeigen ein hohes Maß an Wirtsspezifität. Normalerweise lösen konspezifische Stämme auch dasselbe Befallsbild aus, jedoch scheint *Exobasidium vaccinii* hier eine Ausnahme zu bilden. Weder mit PCR-RFLP- noch Sequenzvergleichen der 26S rDNA lassen sich Stämme, die auf *Vaccinium vitis-idaea* eine lokale Gallbildung hervorrufen, von Stämmen differenzieren, welche eine systemische Infektion verursachen. Auch zeigt sich, daß von europäischen Rhododendren isolierte Stämme, die traditionell *Exobasidium rhododendri* zugeordnet werden, bei diesen Vergleichen distinkte Gruppen bilden, die nicht konspezifisch zueinander sind.

Phylogenetische Analysen im Kontext der Ustilaginomyceten erbringen einen Einblick in die Evolution dieser Pflanzenparasiten. Die Exobasidiales bilden eine gut gestützte Gruppe neben den sechs übrigen Ordnungen der Exobasidiomycetidae. Innerhalb der Ordnung werden mit verschiedenen Verfahren zur Stammbaumrekonstruktion (Parsimony-, Distanzmatrix- und Bayes'sche Analyse) unterschiedliche phylogenetische Hypothesen wiedergegeben. Jedoch bilden die Brachybasidiaceae und Graphiolaceae, die auf monokotylen Wirten auftreten, immer eine monophyletische Gruppe. Die Cryptobasidiaceae, die überwiegend Arten der Laurales parasitieren, bilden meist eine basale Linie. Die Exobasidiaceae, deren Angehörige alle auf Arten der Eudicots leben, bilden nur in den Distanzanalysen eine monophyletische Gruppe. Mit den hier verrechneten Daten gruppieren darüber hinaus die Gattungen *Arcticomycetes* und *Muribasidiospora* immer innerhalb der *Exobasidium*-Arten und die Eigenständigkeit dieser Gattungen erscheint fraglich. Die *Exobasidium*-Arten auf Wirten der Theaceae formen ebenso immer eine monophyletische Gruppe wie diejenigen auf Rhododendren. In Distanzanalysen gruppieren auch die Exobasidien von Wirten aus den Vaccinioideae gemeinsam. Insgesamt legen die phylogenetischen Analysen damit eine Kospeziation oder Koevolution zwischen exobasidialen Pilzen und ihren Wirten nahe. Innerhalb der Exobasidien von Vaccinioideae ergeben sich jedoch komplizierte Evolutionsmuster, welche nur mit Wirtswechseln erklärbar sind. Und innerhalb des *Exobasidium rhododendri*-Komplexes muß sogar von der Speziation auf einer Wirtsart ohne Veränderung des Befallsbildes ausgegangen werden. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen somit komplexe Speziationsprozesse in der Evolution dieser Gattung pflanzenparasitischer Pilze auf.

## 6 Summary

Species delimitation and phylogeny in the plant parasitic fungal genus *Exobasidium* have been studied using molecular data. The traditionally accepted species concept for the European taxa is based on host specificity and the disease symptoms caused by the parasites. The first molecular studies on DNA base composition and DNA homologies, however, were not fully in agreement. Therefore, in this investigation modern tools of molecular systematics have been used to test species delimitations and relationships in a phylogenetic context by utilizing restriction fragment length polymorphisms as well as DNA sequence data. This investigation is focussed on fungal strains from European hosts species of the genera *Vaccinium* and *Rhododendron*. Cultures of the saprotrophic, yeast-like stage of these parasites were obtained from different collections. A total of 51 fungal strains was investigated. Some of them were included in previous studies and thus data on DNA base composition and DNA homologies were available for comparison. The strains originated from the following host species: *Andromeda polifolia*, *Menziesia ferruginea*, *Rhododendron degronianum*, *Rh. ferrugineum*, *Rh. hirsutum*, *Rh. indicum*, *Rh. x intermedium*, *Thea sinensis*, *Vaccinium macrocarpum*, *V. myrtillus*, *V. oxycoccos*, *V. uliginosum*, *V. vitis-idaea*.

For a molecular characterization restriction fragment length polymorphisms of PCR amplified fragments (PCR-RFLPs) of the 26S rRNA gene were produced with five restriction enzymes. The amplified 5' part of the 26S rRNA gene is coding for a ca. 2.2 kb fragment of the 26S rRNA. PCR-RFLP data were obtained using images analysis software including densitometric analysis, and thus groups of strains with identical RFLPs patterns are established. Dendrograms calculated from a binary matrix are used as a similarity measure between different RFLP patterns. In total 20 clusters with different RFLP patterns are found. Strains with identical RFLP patterns possess a similar G+C content and show high DNA homologies. Thus, identity of the PCR-RFLP patterns of the 5' part of the 26S rRNA gene indicates conspecificity. Unexpectedly, some strains with high DNA homology as well as some strains originating from the same host individual ('monospore cultures') are separated in two distinct RFLP groups. Furthermore, the dendrograms show unequal genetic distances between certain RFLP groups. Subsequent sequence analyses of the domain I of the 26S rDNA confirmed that strains belonging to the same RFLP group are likely to be members of a single species, but one fungal species can comprise strains from more than one RFLP group. Therefore, differences in RFLP-PCR patterns of the 5' part of the 26S rRNA gene can not contradict conspecificity. Two different reasons for the unexpected results of the PCR-RFLP analyses were found. First, the amplified region of the 26S rDNA contains larger insertions which are not species specific. Second, by phylogenetic analyses some of the

sequenced strains cluster elsewhere in the Ustilaginomycetes, and could thus be identified as contaminating fungi.

The insertions possess typical characteristics of group I introns. They are located at position 929/930 and 1.127/1.128 compared to the 26S rDNA of *Saccharomyces cerevisiae*. PCR products of *Exobasidium* strains can be grouped in five distinct size classes (2.2, 2.5, 2.6, 2.8 and 2.9 kb) whereas those of strains identified as contaminations lack introns. With only two insertion sites the four intron containing size classes are explained by the presence of different introns at the same insertion site as well as a combination of introns at both sites. At position 929/930 an intron of either ca. 300 bp or ca. 400 bp length can be present. At position 1.127/1.128 an intron with ca. 600 bp can occur. The largest PCR product size results from a combination of a ca. 300 bp long intron at the first and a ca. 400 bp long one at the second site. The distribution of these group I introns among strains, which are conspecific according to similarity of their coding regions for the domain I of the 26S rRNA and their DNA homology, clearly shows that introns are not specific for a given *Exobasidium* species, but their distribution varies within species.

For phylogenetic analyses the domain I of the 26S rDNA of selected strains was sequenced and compared with *Exobasidium* sequences retrieved from GENBANK covering also additional hosts (*Eubotryoides grayana*, *Lyonia neziki*, *Symplocus* spec.). A total of 46 sequences were aligned over 599 homologous nucleotide positions. Conspecificity between strains could be established utilizing the available data on DNA homology and a high degree of sequence homology, i.e. less than three nucleotides difference. This also allowed fungal cultures, obtained previous to the introduction of the currently accepted species concept, to be assigned to the appropriate taxa.

Members of three RFLP groups showed major sequence divergence compared to the other strains in the domain I of the 26S rDNA. Databank search revealed affinities to the orders Entylomatales and Ustilaginales, respectively. Phylogenetic analysis of these 26S rDNA partial sequences in a broader context of ustilaginomycetous fungi confirmed this as well as did 18S and ITS rDNA sequence comparisons of selected strains. Strain RBF 726 groups together with members of the Ustilaginales (e.g. *Ustilago maydis* and the anamorphic yeast *Pseudozyma antarctica*). Strains PB 2857e and PB 4898-9 show affinities to *Entyloma* species (Entylomatales). Strains PB 383, PB 393 and PB 3276 have high affinities to *Tilletiopsis washingtonensis* (Entylomatales) and may very well be conspecific with this anamorphic yeast. These strains originate from different host plants. As they could not be separated from members of the genus *Exobasidium* by biochemical or physiological characters in previous studies, they had earlier questioned a species concept based on host specificity.

According to several molecular characters and placement in phylogenetic analyses, conspecificity between *Exobasidium* strains could be established. *Exobasidium* species correspond well with host plants, i.e. they show a high degree of host specificity. Usually, conspecific strains also cause a specific type of infection. *Exobasidium vaccinii*, however, seems to be an exception. Strains from *Vaccinium vitis-idaea* which either caused a systemic infection or the formation of local leaf galls can not be separated by PCR-RFLP patterns or sequence comparisons of the 26S rDNA. In addition, strains from European *Rhododendron* species traditionally assigned to *Exobasidium rhododendri* form distinct groups with PCR-RFLPs as well as with sequence data contradicting conspecificity. Cryptic speciation within the *E. rhododendri* complex seems to be likely.

Finally, from phylogenetic analyses in a broader context of ustilaginomycetous fungi insight into the evolution of this plant parasitic genus is gained. The Exobasidiales form a well supported group among to the other six orders of the Exobasidiomycetidae. Within Exobasidiales different phylogenetic hypotheses are obtained by different methods of phylogenetic reconstruction (maximum parsimony, distance matrices and Bayesian analysis). However, the families Brachybasidiaceae and Graphiolaceae, parasites on Monocots, form always a monophyletic group. Cryptobasidiaceae which parasite mainly on Laurales occur mostly as basal lineage within the order. The Exobasidiaceae as parasites of Eudicots form a monophyletic group only in distance based inference. Furthermore, with the data analysed here the genera *Arcticomyces* and *Muribasidiospora* are always nested within the *Exobasidium* species. *Exobasidium* species on Theaceae, however, form a monophyletic group as well as species from *Rhododendron* hosts. The parasites of the Vaccinioideae appear only in the distance based phylogenies monophyletic. In general the phylogenetic analyses suggest cospeciation or coevolution between exobasidialean fungi and their hosts. Within the species from Vaccinioideae the evolutionary pattern is more complex as host jumps must be considered in order to explain the phylogeny of the parasites. Within the *Exobasidium rhododendri* complex even within-host speciation has to be considered. Thus, the results presented here suggest complex speciation processes in the evolution of this genus of plant pathogenic fungi.

## 7 Literatur

### 7.1 Literaturverzeichnis

Die Abkürzung der Zeitschriften folgt soweit möglich BIOSIS (2000). Das Literaturverzeichnis umfaßt auch die verwendete Software.

- AANEN, D.K., T.W. KUYPER & R.F. HOEKSTRA (2001) A widely distributed ITS polymorphism within a biological species of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma velutipes*. *Mycol. Res.* **105**: 284-290.
- AGERER, R., J. AMMAIRATI, P. BLANZ, R. COURTECUISE, D.E. DESJARDIN, W. GAMS, H. HALLENBERG, R.E. HALLING, D.L. HAWKSWORTH, E. HORAK, R.P. KORF, G.M. MUELLER, F. OBERWINKLER, G. RAMBOLD, R.C. SUMMERBELL, D. TRIEBEL & R. WATLING (2000) Always deposit vouchers. *Mycol. Res.* **104**: 643-644.
- ALI, A.B., H. WUYTS, R. DE WACHTER, A. MEYER & Y. VAN DE PEER (1999) Construction of a variability map for eukaryotic large subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* **27**: 2825-2831.
- ALTSCHUL, S.F., T.L. MADDEN, A.A. SCHÄFFER, J. ZHANG, Z. ZHANG, W. MILLER & D.J. LIPMAN (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- ANDERSON, D.L., A.J. GIBBS & N.L. GIBSON (1998) Identification and phylogeny of spore-cyst fungi (*Ascospaera* spp.) using ribosomal DNA sequences. *Mycol. Res.* **102**: 541-547.
- ANDERSON, J.B., D.M. PETSCHKE & M.L. SMITH (1987) Restriction fragment polymorphisms in biological species of *Armillaria mella*. *Mycologia* **79**: 69-76.
- ANDERSON, J.B., S.S. BAILEY & P.J. PUKKILA (1989) Variation in ribosomal DNA among biological species of *Armillaria*, a genus of root-infecting fungi. *Evolution* **43**: 1652-1662.
- ANDERSSON, K., O.E. ERIKSSON & S. LANDVIK (1995) Boliniaceae transferred to Sordariales (Ascomycota). *Syst. Ascomycetum* **14**: 1-16.
- APG (1998) An ordinal classification for the families of flowering plants. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **85**: 531-553.
- APPLIED BIOSYSTEMS (1994) *Sequence Navigator*, Version 1.0.
- ARNHEIM, N. (1983) *Concerted evolution of multigene families*. In: Evolution of Genes and Proteins [Hrsg.: NEI, M. & R.K. KOEHN], S. 38-61, Sinauer Associates Inc., Sunderland/Massachusetts.
- ARNHEIM, N. & H. ERLICH (1992) Polymerase chain reaction strategy. *Annu. Rev. Biochem.* **61**: 131-156.
- AVISE, J.C. & K. WOLLENBERG (1997) Phylogenetics and the origin of species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 7748-7755.
- BAHARAEEN, S., U. MELCHER & H.S. VISHNIAC (1983) Complementary DNA-25S ribosomal RNA hybridization: an improved method for phylogenetic studies. *Can. J. Microbiol.* **29**: 546-551.
- BAK, A.L. & A. STENDERUP (1969) Deoxyribonucleic acid homology in yeasts. Genetic relatedness within the genus *Candida*. *J. Gen. Microbiol.* **59**: 21-30.

- BAN, N., P. NISSEN, J. HANSEN, P.B. MOORE & T.A. STEITZ (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**: 905-920.
- BANDONI, R.J. (1985) On an undescribed, pleomorphic hyphomycete from litter. *Bot. J. Linn. Soc.* **91**: 37-43.
- BANDONI, R.J. (1995) Dimorphic Heterobasidiomycetes: Taxonomy and parasitism. *Stud. Mycol.* **38**: 13-27.
- BARTNICKI-GARCIA, S. (1968) Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* **22**: 87-108.
- BARTNICKI-GARCIA, S. (1970) *Cell wall composition and other biochemical markers in fungal phylogeny*. In: *Phytochemical Phylogeny. Proceedings of the Phytochemical Society Symposium, Bristol, April 1969* [Hrsg.: HARBORNE, J.B.], S. 81-103, Academic Press, London, New York.
- BAUER, R. & F. OBERWINKLER (1997) The Ustomycota: an inventory. *Mycotaxon* **64**: 303-319.
- BAUER, R., F. OBERWINKLER & K. VÁNKY (1997) Ultrastructural markers and systematics in smut fungi and allied taxa. *Can. J. Bot.* **75**: 1273-1314.
- BAUER, R., D. BEGEROW & F. OBERWINKLER (1998) Fortschritte in der Systematik der Brandpilze. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz* **105**: 224-238.
- BAUER, R., K. VANKY, D. BEGEROW & F. OBERWINKLER (1999) Ustilaginomycetes on *Selaginella*. *Mycologia* **91**: 475-484.
- BAUER, R., D. BEGEROW, A. NAGLER & F. OBERWINKLER (2001a) The Geogefischeriales: a phylogenetic hypothesis. *Mycol. Res.* **105**: 416-424.
- BAUER, R., D. BEGEROW, F. OBERWINKLER, M. PIEPENBRING & M.L. BERBEE (2001b) *Ustilaginomycetes*. In: *Systematics and Evolution. Vol. VII Part B. The Mycota. A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research* [Hrsg.: MCLAUGHLIN, D.J., E.G. MCLAUGHLIN & P.A. LEMKE], S. 57-83, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- BEGEROW, D., R. BAUER & F. OBERWINKLER (1997) Phylogenetic studies on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences of smut fungi and related taxa. *Can. J. Bot.* **75**: 2045-2056.
- BEGEROW, D. (1998) *Molekulare Analysen zur Phylogenie der Ustilaginomyceten*. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- BEGEROW, D., R. BAUER & T. BOEKHOUT (2000) Phylogenetic placements of ustilaginomycetous anamorphs as deduced from nuclear LSU rDNA sequences. *Mycol. Res.* **104**: 53-60.
- BEGEROW, D., R. BAUER & F. OBERWINKLER (2001) *Muribasidiospora*: Microstromatales or Exobasidiales? *Mycol. Res.* **105**: 798-810.
- BEGEROW, D., R. BAUER & F. OBERWINKLER (2002a) The Exobasidiales: an evolutionary hypothesis. *Mycol. Progress* **1**: 187-199.
- BEGEROW, D., M. LUTZ & F. OBERWINKLER (2002b) Implications of molecular characters for the phylogeny of the genus *Entyloma*. *Mycol. Res.* **106**: 1392-1399.
- BENSON, D.A., I. KARSCH-MIZRACHI, D.J. LIPMAN, J. OSTELL, B.A. RAPP & D.L. WHEELER (2002) GenBank. *Nucleic Acids Res.* **30**: 17-20.
- BERBEE, M.L. & J.W. TAYLOR (1992) Convergence in ascospore discharge mechanism among pyrenomycete fungi based on 18S ribosomal RNA gene sequence. *Mol. Phylogenet. Evol.* **1**: 59-71.
- BERBEE, M.L., D.A. CARMEAN & K. WINKA (2000) Ribosomal DNA and resolution of branching order among the Ascomycota; how many nucleotides are enough? *Mol. Phylogenet. Evol.* **17**: 337-344.

- BERBEE, M.L. & J.W. TAYLOR (2001) *Fungal molecular evolution: gene trees and geologic time*. In: Systematics and Evolution. Vol. VII Part B. The Mycota. A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research [Hrsg.: McLAUGHLIN, D.J., E.G. McLAUGHLIN & P.A. LEMKE], S. 229-245, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- BERRES, M.E., L.J. SZABO & D.J. McLAUGHLIN (1995) Phylogenetic relationships in auriculariaceous basidiomycetes based on 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia* **87**: 821-840.
- BHATTACHARYA, D., F. LUTZONI, V. REEB, D. SIMON, J. NASON & F. FERNANDEZ (2000) Widespread occurrence of spliceosomal introns in the rDNA genes of ascomycetes. *Mol. Biol. Evol.* **17**: 1971-1984.
- BICKNELL, J.N. & H.C. DOUGLAS (1970) Nucleic acid homologies among species of *Saccharomyces*. *J. Bacteriol.* **101**: 505-512.
- BINDER, M. & D.S. HIBBETT (2002) Higher-level phylogenetic relationships of Homobasidiomycetes (mushroom-forming fungi) inferred from four rDNA regions. *Mol. Phylogenet. Evol.* **22**: 76-90.
- BIOSIS (2000) *BIOSOS Serial Sources, Volume 2000*, BIOSIS, Two Commerce Square, 2001 Market Street, Suite 700, Philadelphia, PA 19103-7095, USA.
- BLANZ, P.A. (1977) *Vergleichende Merkmalsanalysen an Exobasidium-Arten und verwandten Basidiomyceten*. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- BLANZ, P.A. (1978) Über die systematische Stellung der Exobasidiales. *Z. Mykol.* **44**: 91-107.
- BLANZ, P.A. & F. OBERWINKLER (1983) A contribution to the species definition in the genus *Exobasidium* (Basidiomycetes). *Syst. Appl. Microbiol.* **4**: 199-206.
- BLANZ, P.A. & M. GOTTSCHALK (1984) A comparison of 5S ribosomal RNA nucleotide sequences from smut fungi. *Syst. Appl. Microbiol.* **5**: 518-526.
- BLANZ, P.A. (1986) DNA/DNA-Homologien in der Gattung *Exobasidium* (Basidiomycetes). In: *Frühjahrstagung der VAAM und der Sektion I der DGHM*. Vol. Posterpräsentation, S. P48, Münster.
- BLANZ, P.A. & M. GOTTSCHALK (1986) Systematic position of *Septobasidium*, *Graphiola* and other Basidiomycetes as deduced on the basis of their 5S ribosomal RNA nucleotide sequences. *Syst. Appl. Microbiol.* **8**: 121-127.
- BLANZ, P.A. & M. UNSELD (1987) Ribosomal RNA as a taxonomic tool in mycology. *Stud. Mycol.* **30**: 247-258.
- BLANZ, P.A., M.G. UNSELD & I. RAUH (1989) Group-specific differences in the secondary structure of the 28S ribosomal RNA of yeasts. In: *Seventh International Symposium on Yeasts*, S. S399-S404, John Wiley & Sons Ltd.
- BLANZ, P.A. & H. DÖRING (1995) Taxonomic relationships in the genus *Exobasidium* (Basidiomycetes) based on ribosomal DNA analysis. *Stud. Mycol.* **38**: 119-127.
- BOEKHOUT, T. (1987) *Systematics of anamorphs of Ustilaginales (smut fungi) - a preliminary survey*. In: The Expanding Realm of Yeast-Like Fungi [Hrsg.: DE HOOG, G.S., M.T. SMITH & A.C.M. WEIJMAN], S. 137-149, Amsterdam.
- BOEKHOUT, T. (1991) A revision of ballistoconidia-forming yeasts and fungi. *Stud. Mycol.* **33**: 1-194.
- BOEKHOUT, T., J. VAN GOOL, H. VAN DEN BOOGERT & T. JILLE (1992) Karyotyping and G+C composition as taxonomic criteria applied to the systematics of *Tilletiopsis* and related taxa. *Mycol. Res.* **96**: 331-342.
- BOEKHOUT, T., A. FONSECA, J.-P. SAMPAIO & W.I. GOLUBEV (1993) Classification of hetero-

- basidiomycetous yeasts: characteristics and affiliation of genera to higher taxa of Heterobasidiomycetes. *Can. J. Microbiol.* **39**: 276-290.
- BOEKHOUT, T., C.P. KURZTMAN, K. O'DONNELL & M.T. SMITH (1994) Phylogeny of the yeast genera *Hanseniaspora* (Anamorph *Kloeckera*), *Dekkera* (Anamorph *Brettanomyces*), and *Eeniella* as inferred from partial 26S ribosomal DNA nucleotide sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 781-786.
- BOEKHOUT, T. (1995) *Pseudozyma Bandoni* emend. Boekhout, a genus for yeast-like anamorphs of Ustilaginales. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **41**: 359-366.
- BOEKHOUT, T., J.W. FELL & K. O'DONNELL (1995) Molecular systematics of some yeast-like anamorphs belonging to the Ustilaginales and Tilletiales. *Stud. Mycol.* **38**: 175-183.
- BOEKHOUT, T. (1998) *Tilletiopsis Derox ex Derox*. In: The Yeasts, a Taxonomic Study [Hrsg.: KURTZMAN, C.P. & J.W. FELL], S. 848-853, Elsevier Science B.V., Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokyo.
- BOEKHOUT, T., R.J. BANDONI, J.W. FELL & K.J. KWON-CHUNG (1998) *Discussion of teleomorphic and anamorphic genera of heterobasidiomycetous yeasts*. In: The Yeasts, a Taxonomic Study [Hrsg.: KURTZMAN, C.P. & J.W. FELL], S. 609-625, Elsevier Science B.V., Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokyo.
- BOEKHOUT, T. & J.W. FELL (1998) *Pseudozyma Bandoni* emend. Boekhout and a comparison with the yeast state of *Ustilago maydis* (De Candolle) Corda. In: The Yeasts, a Taxonomic Study [Hrsg.: KURTZMAN, C.P. & J.W. FELL], S. 790-797, Elsevier Science B.V., Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokyo.
- BOEKHOUT, T., B. THEELEN, J. HOUBRAKEN, V. ROBERT, G. SCORZETTI, A. GAFNI, U. GERSON & A. SZTEJNBERG (2003) New anamorphic mite-associated fungi belonging to the Ustilaginomycetes: *Meira geulakonigii* gen. nov., sp. nov., *Meira argovae* sp. nov. and *Acaromyces ingoldii* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 1655-1664.
- BOUDIER, E. & E. FISCHER (1894) Rapport sur les espèces de champignons trouvées pendant l'assemblée à Genève et les excursions faites en Valais, par les Sociétés de Botanique de France et de Suisse, du 5 au 15 Aout 1894. *Bull. Soc. Bot. Fr.* **41**: 237-244.
- BOWEN, A.R., J.L. CHEN-WU, M. MOMANY, R. YOUNG, P.J. SZANISZLO & P.W. ROBBINS (1992) Classification of fungal chitin synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 519-523.
- BOWMAN, B.H., J.W. TAYLOR, A.G. BROWNLEE, J. LEE, S.-D. LU & T.J. WHITE (1992) Molecular evolution of the fungi: relationship of the Basidiomycetes, Ascomycetes, and Chytridiomycetes. *Mol. Biol. Evol.* **9**: 285-296.
- BREFELD, O. (1889) *Die Gattung Exobasidium*. In: Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie. Vol. 8, S. 12-18.
- BRESINSKY, A., M. JAROSCH, M. FISCHER, I. SCHÖNBERGER & B. WITTMANN-BRESINSKY (1999) Phylogenetic relationships within *Paxillus* s.l. (Basidiomycetes, Boletales): separation of a Southern Hemisphere genus. *Plant Biol. (Stuttg.)* **1**: 327-333.
- BROOKS, D.R. (1988) Macroevolutionary comparisons of host and parasite phylogenies. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **19**: 235-259.
- BRUMMITT, R.K. & C.E. POWELL [Hrsg.] (1992) *Authors of Plant Names*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- BRUNS, T.D. & J.D. PALMER (1989) Evolution of mushroom mitochondrial DNA: *Suillus* and related genera. *J. Mol. Evol.* **28**: 349-362.
- BRUNS, T.D., R. FOGEL & J.W. TAYLOR (1990) Amplification and sequencing of DNA from fungal herbarium specimens. *Mycologia* **82**: 175-184.
- BRUNS, T.D., T.J. WHITE. & J.W. TAYLOR (1991) Fungal molecular systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **22**: 525-564.



- BRUNS, T.D. & T.M. SZARO (1992) Rate and mode differences between nuclear and mitochondrial small-subunit rRNA genes in mushrooms. *Mol. Biol. Evol.* **9**: 836-855.
- BRUNS, T.D., R. VILGALYS, S.M. BARNES, D. GONZALEZ, D.S. HIBBETT, D.J. LANE, L. SIMON, S. STICKEL, T.M. SZARO, W.G. WEISBURG & M.L. SOGIN (1992) Evolutionary relationships within the fungi: analyses of nuclear small subunit rRNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* **1**: 231-241.
- BUCKNER, B., C.P. NOVOTNY & R.C. ULLRICH (1988) Organization of the ribosomal RNA genes of *Schizophyllum commune*. *Curr. Genet.* **13**: 417-424.
- BUNYARD, B.A., M.S. NICHOLSON & D.J. ROYSE (1994) A systematic assessment of *Morchella* using RFLP analysis of the 28S ribosomal RNA gene. *Mycologia* **86**: 762-772.
- BUNYARD, B.A., M.S. NICHOLSON & D.J. ROYSE (1995) Phylogenetic resolution of *Morchella*, *Verpa*, and *Disciotis* (Pezizales: Morchellaceae) based on restriction enzyme analysis of the 28S ribosomal RNA gene. *Exp. Mycol.* **19**: 223-233.
- BURKE, J.M., M. BELFORT, T.R. CECH, R.W. DAVIES, R.J. SCHWEYEN, D.A. SHUB, J.W. SZOSTAK & H.F. TABAK (1987) Structural conventions for group I introns. *Nucleic Acids Res.* **15**: 7217-7221.
- BURT, E.A. (1915) The Thelephoraceae of North America. IV *Exobasidium*. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **2**: 627-656.
- CALVO-BADO, L.A., M.P. CHALLEN, C.F. THURSTON & T.J. ELLIOTT (2001) RAPD characterisation of heterogeneity in spore progenies and sexuality in the genus *Agaricus*. *Mycol. Res.* **105**: 370-376.
- CAMIN, J.H. & R.R. SOKAL (1965) A method of deducing branching sequences in phylogeny. *Evolution* **19**: 311-326.
- CANNONE, J.J., S. SUBRAMANIAN, M.N. SCHNARE, J.R. COLLETT, L.M. D'SOUZA, Y. DU, B. FENG, N. LIN, L.V. MADABUSI, K.M. MÜLLER, N. PANDE, Z. SHANG, N. YU & R.R. GUTELL (2002) The Comparative RNA Web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs. *BMC Bioinformatics* **3**: 2.
- CARDER, J.H. & D.J. BARBARA (1991) Molecular variation and restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) within and between six species of *Verticillium*. *Mycol. Res.* **95**: 935-942.
- CARPENTER, J.M. (1988) Choosing among multiple equally parsimonious cladograms. *Cladistics* **4**: 291-296.
- CARTER, A.P., W.M. CLEMONS, D.E. BRODERSEN, R.J. MORGAN-WARREN, B.T. WIMBERLY & V. RAMAKRISHNAN (2000) Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* **407**: 340-348.
- CECH, T.R. (1988) Conserved sequences and structures of group I introns: building an active site for RNA catalysis - a review. *Gene* **73**: 259-271.
- CECH, T.R. (2000) The ribosome is a ribozyme. *Science* **289**: 878-879.
- CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES (1996) *List of Cultures, Fungi and Yeasts*. 34. Aufl., Baarn.
- CHAMBERLAIN, D.F. (1982) A revision of *Rhododendron*. II Subgenus *Hymenanthes*. *Notes R. Bot. Gard. Edinb.* **39**: 209-486.
- CHAMBERLAIN, D.F. & S.J. RAE (1990) A revision of *Rhododendron*. IV Subgenus *Tsutsusi*. *Edinb. J. Bot.* **47**: 89-200.
- CHASE, M.W., D.E. SOLTIS, R.G. OLMSTEAD et al. (1993) Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **80**: 528-580.

- CHAVERRI, P., L.A. CASTLEBURY, G.J. SAMUELS & D.M. GEISER (2003) Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/*Hypocrea lixii* complex. *Mol. Phylogenet. Evol.* **27**: 302-313.
- CHEN, M.-W., J. ANNÉ, G. VOLCKAERT, E. HUYMANS, A. VANDENBERGHE & R. DE WACHTER (1984) The nucleotide sequences of the 5S rRNAs of seven molds and a yeast and their use in studying ascomycete phylogeny. *Nucleic Acids Res.* **12**: 4881-4892.
- CHRISTENSEN, J.J. [Hrsg.] (1963) *Corn Smut Caused by Ustilago maydis*. In: Monograph. Vol. 2 [Hrsg.: AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY].
- CLARK, C.G., B.W. TAGUE, V.C. WARE & S.A. GERBI (1984) *Xenopus laevis* 28S ribosomal RNA: a secondary structure model and its evolutionary and functional implications. *Nucleic Acids Res.* **12**: 6197-6220.
- CLINE, W.O. (1998) An *Exobasidium* disease of fruit and leaves of highbush blueberry. *Plant Dis.* **82**: 1064.
- CRAMER, C. (1875) *Rabenhorst, Fungi europaei no. 1910. Exobasidium rhododendri*. In: *Fungi Europaei Exsiccati, Klotzschii Herbarii Vivi Mycologici Continuatio. Editio nova* [Hrsg.: RABENHORST, L.], Dresden.
- CROUS, P.W. (2002) Adhering to good culture practice (GCP). *Mycol. Res.* **106**: 1378-1379.
- CRUSE, M., R. TELERANT, T. GALLAGHER, T. LEE & J.W. TAYLOR (2002) Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. *Mycologia* **94**: 814-822.
- CUBERO, O.F., P.D. BRIDGE & A. CRESPO (2000) Terminal-sequence conservation identifies spliceosomal introns in ascomycete 18S RNA genes. *Mol. Biol. Evol.* **17**: 751-756.
- CUBETA, M.A., E. ECHANDI, T. ABERNETHY & R. VILGALYS (1991) Characterization of anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* species using restriction analysis of an amplified ribosomal RNA gene. *Phytopathology* **81**: 1395-1400.
- CULLEN, J. (1980) A revision of *Rhododendron*. I Subgenus *Rhododendron* sections *Rhododendron* & *Pogonanthum*. *Notes R. Bot. Gard. Edinb.* **39**: 1-207.
- CUNNINGHAM, J.L., B.K. BAKSHI & P.L. LENTZ (1976) Two new genera of leaf-parasitic fungi (Basidiomycetidae: Brachybasidiaceae). *Mycologia* **68**: 640-654.
- CURRAN, J., F. DRIVER, J.W.O. BALLARD & R.J. MILNER (1994) Phylogeny of *Metarhizium*: analysis of ribosomal DNA sequence data. *Mycol. Res.* **98**: 547-552.
- CYBERTECH (1993) *CAM. Image Processing Software for Molecular Biology, Version 2.0* (DOS).
- DAHLMAN, M., E. DANELL & J.W. SPATAFORA (2000) Molecular systematics of *Craterellus*: cladistic analysis of nuclear LSU rDNA sequence data. *Mycol. Res.* **104**: 388-394.
- DAMS, E., L. HENDRIKS, Y. VAN DE PEER, J.-M. NEEFS, G. SMITS, I. VANDENBEMPT & R. DE WACHTER (1988) Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Res. Suppl.* **16**: 87-173.
- DAYHOFF, M.O., C.M. PARK & P.J. McLAUGHLIN (1972) *Building a phylogenetic tree: cytochrome c*. In: *Atlas of Protein Sequence and Structure. Vol. 5* [Hrsg.: DAYHOFF, M.O.], S. 7-16.
- DE WACHTER, R., J.-M. NEEFS, A. GORIS & Y. VAN DE PEER (1992) The gene coding for small ribosomal subunit RNA in the basidiomycete *Ustilago maydis* contains a group I intron. *Nucleic Acids Res.* **20**: 1251-1257.
- DEPRIEST, P.T. & M.D. BEEN (1992) Numerous group I introns with variable distribution in the ribosomal DNA of a lichen fungus. *J. Mol. Biol.* **228**: 315-321.
- DICE, L.R. (1945) Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* **26**: 297-302.
- DIXON, M.T. & D.M. HILLIS (1993) Ribosomal RNA secondary structure: Compensatory

- mutations and implications for phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* **10**: 256-267.
- DLAUCHY, D., J. TORNAL-LEHOCZKI & G. PÉTER (1999) Restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA as a taxonomic tool in yeast identification. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**: 445-453.
- DODD, S.L., R.N. CROWHURST, A.G. RODRIGO, G.J. SAMUELS, R.A. HILL & A. STEWART (2000) Examination of *Trichoderma* phylogenies derived from ribosomal DNA sequence data. *Mycol. Res.* **104**: 23-34.
- DONIS-KELLER, H., A.M. MAXAM & W. GILBERT (1977) Mapping adenines, guanines, and pyrimidines in RNA. *Nucleic Acids Res.* **4**: 2527-2538.
- DONK, M.A. (1956) The generic names proposed for Hymenomycetes VI, Brachybasidiaceae, Cryptobasidiaceae, Exobasidiaceae. *Reinwardtia* **4**: 113-118.
- DONK, M.A. (1966) Check list of European hymenomycetous Heterobasidiae. *Persoonia* **4**: 145-335.
- DONK, M.A. (1973) The Heterobasidiomycetes: a reconnaissance IV. *Proc. K. Ned. Akad. Wet.* **C 76**: 109-125.
- DONK, M.A. (1974) Check list of European hymenomycetous Heterobasidiae. Supplement and corrections. *Persoonia* **8**: 33-50.
- DÖRFLER, C. (1990) Vergleichende Untersuchungen zum biochemischen Aufbau der Zellwand an Hefestadien von niederen und höheren Basidiomyceten. *Bibl. Mycol.* **129**.
- DÖRING, H., P. CLERC, M. GRUBE & M. WEDIN (2000) Mycobiont-specific PCR primers for the amplification of nuclear ITS and LSU rDNA from lichenized ascomycetes. *Lichenologist* **32**: 200-204.
- DOVER, G. (1982) Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature* **299**: 111-117.
- DOVER, G. (1994) Concerted evolution, molecular drive and natural selection. *Curr. Biol.* **4**: 1165.
- DOYLE, J.J. & J.L. DOYLE (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* **19**: 11-15.
- DOYLE, J.J. (1992) Gene trees and species trees: molecular systematics as one-character taxonomy. *Syst. Bot.* **17**: 144-163.
- DUJON, B. (1989) Group I introns as mobile genetic elements: facts and mechanistic speculations - a review. *Gene* **82**: 91-114.
- DUTTA, S.K., I. SHEIKH, J. CHOPPALA, G.S. AULAKH & W.H. NELSON (1976) DNA homologies among homothallic, pseudo-homothallic and heterothallic species of *Neurospora*. *Mol. Gen. Genet.* **147**: 325-330.
- EDEL, V., C. STEINBERG, N. GAUTHERON & C. ALABOUVETTE (1996) Evaluation of restriction analysis of polymerase chain reaction (PCR)-amplified ribosomal DNA for the identification of *Fusarium* species. *Mycol. Res.* **101**: 179-187.
- EDMAN, J.C., J.A. KOVACS, H. MASUR, D.V. SANTI, H.J. ELWOOD & M.L. SOGIN (1988) Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. *Nature* **334**: 519-522.
- EFTIMIU, P. & S. KHARBUSH (1927) Recherches histologiques sur les Exobasidiées. *Rev. Path. Veg.* **14**: 62-88.
- EGGER, K.N., R.M. DANIELSON & J.A. FORTIN (1991) Taxonomy and population structure of E-strain mycorrhizal fungi inferred from ribosomal and mitochondrial DNA polymorphisms. *Mycol. Res.* **95**: 866-872.
- EGGER, K.N. (1995) Molecular analysis of ectomycorrhizal fungal communities. *Can. J. Bot.* **73**: S1415-S1422.

- ELWOOD, H.J., G.J. OLSEN & M.L. SOGIN (1985) The small-subunit ribosomal RNA gene sequences from the hypotrichous ciliates *Oxytricha nova* and *Stylonychia pustulata*. *Mol. Biol. Evol.* **25**: 339-410.
- ERLAND, S. (1995) Abundance of *Tylospora fibrillosa* ectomycorrhizas in a South Swedish spruce forest measured by RFLP analysis of the PCR-amplified rDNA ITS region. *Mycol. Res.* **99**: 1425-1428.
- FARRIS, J.S. (1969a) On the cophenetic correlation coefficient. *Syst. Zool.* **18**: 279-285.
- FARRIS, J.S. (1969b) A successive approximations approach to character weighting. *Syst. Zool.* **18**: 374-385.
- FARRIS, J.S. (1970) Methods for computing Wagner trees. *Syst. Zool.* **19**: 83-92.
- FARRIS, J.S. (1977) Phylogenetic analysis under Dollo's law. *Syst. Zool.* **26**: 77-88.
- FARRIS, J.S. (1989a) The retention index and homoplasy excess. *Syst. Zool.* **38**: 406-407.
- FARRIS, J.S. (1989b) The retention index and the rescaled consistency index. *Cladistics* **5**: 417-419.
- FELL, J.W., T. BOEKHOUT & D.W. FRESHWATER (1995) The role of nucleotide sequence analysis in the systematics of the yeast genera *Cryptococcus* and *Rhodotorula*. *Stud. Mycol.* **38**: 129-146.
- FELL, J.W., T. BOEKHOUT, A. FONSECA, G. SCORZETTI & A. STATZELL-TALLMAN (2000) Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 1351-1371.
- FELL, J.W., T. BOEKHOUT, A. FONSECA & J.P. SAMPAIO (2001) *Basidiomycetous yeasts*. In: Systematics and Evolution. Vol. VII Part B. The Mycota. A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research [Hrsg.: MCLAUGHLIN, D.J., E.G. MCLAUGHLIN & P.A. LEMKE], S. 3-35, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- FELSENSTEIN, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17**: 368-376.
- FELSENSTEIN, J. (1988) Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Annu. Rev. Gen.* **22**: 521-565.
- FELSENSTEIN, J. (1993) *PHYLIP. Phylogenetic Inference Package*, Version 3.5c, März 1993, Joseph Felsenstein and the University of Washington, Seattle/Washington.
- FISCHER, M. (1996) On the species complexes within *Phellinus: Fomitiporia* revisited. *Mycol. Res.* **100**: 1459-1467.
- FITCH, W.M. & E. MARGOLIASH (1967) Construction of phylogenetic trees. A method based on mutation distances as estimated from cytochrome c sequences is of general applicability. *Science* **155**: 179-284.
- FITCH, W.M. (1971) Towards defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst. Zool.* **20**: 406-416.
- FITCH, W.M. (1976) The molecular evolution of cytochrome c in eukaryotes. *J. Mol. Evol.* **8**: 13-40.
- FRIEDL, T. (1996) *Systematik und Phylogenie terrestrischer Grünalgen unter besonderer Berücksichtigung von Flechtenalgen; molekulare und morphologische Merkmalsanalysen*. Habilitationsschrift, Universität Bayreuth.
- FUCKEL, L. (1861) Mykologisches. *Bot. Zeitung* **19**: 249-252.
- FUCKEL, L. (1873/1874) Symbolae mycologicae, Beiträge zur Kenntnis der Rheinischen Pilze. Zweiter Nachtrag. *Jahrbücher des Nassauischen Vereins Naturkunde* **27/28**: 1-99.
- FUCKEL, L. (1876/1877) Symbolae mycologicae, Beiträge zur Kenntnis der Rheinischen Pilze. Dritter Nachtrag. *Jahrbücher des Nassauischen Vereins Naturkunde* **29/30**: 1-39.

- GANLEY, A.R.D. & B. SCOTT (2002) Concerted evolution in the ribosomal RNA genes of an *Epichloë* endophyte hybrid: comparison between tandemly arranged rDNA and dispersed 5S *rrn* genes. *Fungal Genet. Biol.* **35**: 39-51.
- GARBER, R.C., B.G. TURGEON, E.U. SELKER & O.C. YODER (1988) Organization of ribosomal RNA genes in the fungus *Cochliobolus heterostrophus*. *Curr. Genet.* **14**: 573-582.
- GARDES, M., J.A. FORTIN, G.M. MUELLER & B.R. KROPP (1990) Restriction fragment length polymorphisms in the nuclear ribosomal DNA of four *Laccaria* spp.: *L. bicolor*, *L. laccata*, *L. proxima*, and *L. amethystina*. *Phytopathology* **80**: 1312-1317.
- GARDES, M., G.M. MUELLER, J.A. FORTIN & B.R. KROPP (1991a) Mitochondrial DNA polymorphisms in *Laccaria bicolor*, *L. laccata*, *L. proxima* and *L. amethystina*. *Mycol. Res.* **95**: 206-216.
- GARDES, M., T.J. WHITE, J.A. FORTIN, T.D. BRUNS & J.W. TAYLOR (1991b) Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Can. J. Bot.* **69**: 180-190.
- GARDES, M. & T.D. BRUNS (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* **2**: 113-118.
- GARGAS, A. & J.W. TAYLOR (1992) Polymerase chain reaction (PCR) primers for amplifying and sequencing nuclear 18S rDNA from lichenized fungi. *Mycologia* **84**: 589-592.
- GARGAS, A., P.T. DEPRIEST, M. GRUBE & A. TEHLER (1995) Multiple origin of lichen symbioses in fungi suggested by SSU rDNA phylogeny. *Science* **268**: 1492-1495.
- GATESY, J., R. DESALLE & W. WHEELER (1993) Alignment-ambiguous nucleotide sites and the exclusion of systematic data. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2**: 152-157.
- GÄUMANN, E. (1926) *Vergleichende Morphologie der Pilze*, Verlag von Gustav Fischer, Jena.
- GCG (1993) *Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources*, Release 3.0, based on the GCG program package version Unix-7.3, 1993, Genetics Computer Group Inc.
- GCG (1994) *Wisconsin Package*, Version 8.0.1-Unix, September 1994, Genetics Computer Group Inc.
- GEORGIEV, O.I., N. NIKOLAEV, A.A. HADJIOLOV, K.G. SKRYABIN, V.M. ZAKHARYEV & A.A. BAYEV (1981) The structure of the yeast ribosomal RNA genes. 4. Complete sequence of the 25S rRNA gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **9**: 6953-6958.
- GERBI, S.A. (1985) *Evolution of the ribosomal DNA*. In: *Molecular Evolutionary Genetics* [Hrsg.: MACINTRYE, R.J.], S. 419-517, Plenum Press, New York.
- GERBI, S.A. (1986) The evolution of eukaryotic ribosomal DNA. *Biosystems* **19**: 247-258.
- GEYLER, H.T. (1874) *Exobasidium lauri* nov. sp. als Ursache der sogenannten Luftwurzeln von *Laurus canariensis* L. *Bot. Zeitung* **32**: 321-326.
- GLASS, N.L. & G.C. DONALDSON (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1323-1330.
- GLEN, M., I.C. TOMMERUP, N.L. BOUGHER & P.A. O'BRIEN (2001) Interspecific and intra-specific variation of ectomycorrhizal fungi associated with *Eucalyptus* ecosystems as revealed by ribosomal DNA PCR-RFLP. *Mycol. Res.* **105**: 843-858.
- GÓMEZ, L.D. & L. KISIMOVA-HOROVITZ (1997) Basidiomicetos de Costa Rica. Exobasidiales, Cryptobasidiales. Notas históricas, taxonómicas y fitogeográficas. *Rev. Biol. Trop.* **45**: 1293-1310.
- GÓMEZ, L.D. & L. KISIMOVA-HOROVITZ (1998) Basidiomicetos de Costa Rica. Nuevas especies de *Exobasidium* (Exobasidiaceae) y registros de Cryptobasidiales. *Rev. Biol. Trop.* **46**: 1081-1093.
- GÖTTGENS, E. (1959) Untersuchungen über die Entwicklung von *Exobasidium azaleae* Peck

- und seine Infektion der Wirtspflanzen unter besonderer Berücksichtigung der gallenbildenden Wirkstoffe. *Phytopathol. Z.* **36**: 394-426.
- GOTTSCHALK, M. & P.A. BLANZ (1984) Highly conserved 5S ribosomal RNA sequences in four rust fungi and atypical 5S rRNA secondary structure in *Microstroma juglandis*. *Nucleic Acids Res.* **12**: 3951-3958.
- GOTTSCHALK, M. & P.A. BLANZ (1985) Untersuchungen an 5S ribosomalen Ribonukleinsäuren als Beitrag zur Klärung von Systematik und Phylogenie der Basidiomyceten. *Z. Mykol.* **51**: 205-243.
- GRAAFLAND, W. (1953) Four species of *Exobasidium* in pure culture. *Acta Bot. Neerl.* **1**: 516-522.
- GRAAFLAND, W. (1957) *Exobasidium japonicum* on Azalea. *Meded. Landbouwhogeschool. Opzoekingsstn. Staat Gent* **22**: 547-551.
- GRAAFLAND, W. (1960) The parasitism of *Exobasidium japonicum* Shir. on Azalea. *Acta Bot. Neerl.* **9**: 347-379.
- GRUBISHA, L.C., J.M. TRAPPE, R. MOLINA & J.W. SPATAFORA (2001) Biology of the ectomycorrhizal genus *Rhizopogon*. V. Phylogenetic relationships in the Boletales inferred from LSU rDNA sequences. *Mycologia* **93**: 82-89.
- GUADET, J., J. JULIEN, J.F. LAFAY & Y. BRYGOO (1989) Phylogeny of some *Fusarium* species, as determined by large subunit rRNA sequence comparison. *Mol. Biol. Evol.* **6**: 227-242.
- GUÉHO, E., C.P. KURTZMAN & S.W. PETERSON (1989) Evolutionary affinities of heterobasidiomycetous yeasts estimated from 18S and 25S ribosomal RNA sequence divergence. *Syst. Appl. Microbiol.* **112**: 230-236.
- GUÉHO, E., C.P. KURTZMAN & S.W. PETERSON (1990) Phylogenetic relationships among species of *Sterigmatomyces* and *Fellomyces* as determined from partial rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**: 60-65.
- GUÉHO, E., L. IMPROVISI, R. CHRISTEN & G.S. DE HOOG (1993) Phylogenetic relationships of *Cryptococcus neoformans* and some related basidiomycetous yeasts determined from partial large subunit RNA sequences. *Antonie Leeuwenhoek* **63**: 175-189.
- GUILLOT, J. & E. GUÉHO (1995) The diversity of *Malassezia* yeasts confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons. *Antonie Leeuwenhoek* **67**: 297-314.
- GUNDERSON, J.H., T.F. MCCUTCHAN & M.L. SOGIN (1986) Sequence of the small subunit ribosomal RNA gene expressed in the bloodstream stages of *Plasmodium berghei*: Evolutionary implications. *J. Protozool.* **33**: 525-529.
- GUTELL, R.R., M.W. GRAY & M.N. SCHNARE (1993) A compilation of large subunit (23S and 23S-like) ribosomal RNA structures: 1993. *Nucleic Acids Res.* **21**: 3055-3074.
- GUTELL, R.R. (1994) Collection of small subunit (16S- and 16S-like) ribosomal RNA structures: 1994. *Nucleic Acids Res.* **22**: 3502-3507.
- GUTELL, R.R., N. LARSEN & C.R. WOESE (1994) Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiol. Rev.* **58**: 10-26.
- GYLLENSTEN, U.B. (1989) PCR and DNA sequencing. *Biotechniques* **7**: 700-707.
- HALL, B.G. (2001) *Phylogenetic Trees Made Easy. A How-To Manual for Molecular Biologists*, Sinauer Associates Inc., Sunderland/Massachusetts.
- HALLENBERG, N., E. LARSSON & M. MAHLAPUU (1996) Phylogenetic studies in *Peniophora*. *Mycol. Res.* **100**: 179-187.
- HAMAMOTO, M., J. SUGIYAMA & K. KOMAGATA (1986) DNA base composition of strains in the genera *Rhodosporidium*, *Cystofilobasidium*, and *Rhodotorula* determined by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **32**: 215-223.
- HAMAMOTO, M., M. TAMURA & T. NAKASE (2000) Emended descriptions of *Tilletiopsis*

- washingtonensis*, *Tilletiopsis cremea* and *Tilletiopsis lilacina*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 925-930.
- HANCOCK, J.M. & A.P. VOGLER (2000) How slippage-derived sequences are incorporated into rRNA variable-region secondary structure: implications for phylogeny reconstruction. *Mol. Phylogenet. Evol.* **14**: 366-374.
- HARRINGTON, F.A. & D. POTTER (1997) Phylogenetic relationships within *Sarcoscypha* based upon nucleotide sequences of the internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA. *Mycologia* **89**: 258-267.
- HASSOUNA, N., B. MICHOT & J.-P. BACHELLERIE (1984) The complete nucleotide sequence of mouse 25S rRNA gene. Implications for the process of size increase of the large subunit rRNA in higher eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* **12**: 3563-3583.
- HAWKSWORTH, D.L., P.M. KIRK, B.C. SUTTON & D.N. PEGLER (1995) *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*. 8. Aufl., University Press, Cambridge.
- HENDRIKS, L., R. DE BAERE, Y. VAN DE PEER, J. NEEFS, A. GORIS & R. DE WACHETER (1991) The evolutionary position of the rhodophyte *Porphyra umbilicalis* and the basidiomycete *Leucosporidium scottii* among other eukaryotes as deduced from complete sequences of small ribosomal subunit RNA. *J. Mol. Evol.* **32**: 167-177.
- HENNIG, W. (1998) *Genetik (Kapitel 12: Molekulare Struktur eukaryotischer Gene)*. 2. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg.
- HENNINGS, P. (1900) *Exobasidiineae*. In: Die natürlichen Pflanzenfamilien. 1. Teil, 1. Abteilung [Hrsg.: ENGLER, A. & K. PRANTL], S. 103-105, Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- HENNINGS, P. (1902) Fungi japonici IV. *Bot. Jahrb. Syst.* **31**: 728-742.
- HENNINGS, P. (1902 ("1903")) Fungi japonici III. *Bot. Jahrb. Syst.* **32**: 34-46.
- HENRION, B., G. CHEVALIER & F. MARTIN (1994) Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycol. Res.* **98**: 37-43.
- HENSON, J.M. (1992) DNA hybridization and polymerase chain reaction (PCR) tests for identification of *Gaeumannomyces*, *Phialophora* and *Magnaporthe* isolates. *Mycol. Res.* **96**: 629-636.
- HIBBETT, D.S. & R. VILGALYS (1991) Evolutionary relationships of *Lentinus* to the Polyporaceae: Evidence from restriction analysis of enzymatically amplified ribosomal RNA. *Mycologia* **83**: 425-439.
- HIBBETT, D.S. & R. VILGALYS (1993) Phylogenetic relationships of *Lentinus* (Basidiomycotina) inferred from molecular and morphological characters. *Syst. Bot.* **18**: 409-433.
- HIBBETT, D.S. (1995) Phylogenetic diversity in shiitake inferred from nuclear ribosomal DNA sequences. *Mycologia* **87**: 618-638.
- HIBBETT, D.S. & M.J. DONOGHUE (1995) Progress toward a phylogenetic classification of the Polyporaceae through parsimony analysis of mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Can. J. Bot.* **73**: S853-S861.
- HIBBETT, D.S., K. HANSEN & M.J. DONOGHUE (1998) Phylogeny and biogeography of *Lentinula* inferred from an expanded rDNA dataset. *Mycol. Res.* **102**: 1041-1049.
- HIJWEGEN, T. (1988) *Coevolution of flowering plants with pathogenic fungi*. In: *Coevolution of Fungi with Plants and Animals* [Hrsg.: PIROZYNSKI, K.A. & D.L. HAWSKWORTH], Academic press, London.
- HILLIS, D.M. & M.T. DIXON (1991) Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.* **66**: 411-453.
- HILLIS, D.M., C. MORITZ, C.A. PORTER & R.J. BAKER (1991) Evidence for biased gene conversion in concerted evolution of ribosomal DNA. *Science* **251**: 308-310.

- HILLIS, D.M., M.W. ALLARD & M.M. MIYAMOTO (1993) Analysis of DNA sequence data: phylogenetic inference. *Methods Enzymol.* **224**: 456-487.
- HILLIS, D.M. (1998) Taxonomic sampling, phylogenetic accuracy, and investigator bias. *Syst. Biol.* **47**: 3-8.
- HIRATA, S. (1981a) A new species of *Exobasidium* parasitic on *Symplocos theophrastaefolia*. *Trans. Mycol. Soc. Jpn.* **22**: 61-63.
- HIRATA, S. (1981b) A new species of *Exobasidium* causing giant galls on *Camellia japonica*. *Trans. Mycol. Soc. Jpn.* **22**: 393-395.
- HOFFMANN, C.S. & F. WINSTON (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently release autonomous plasmids for transformation of *E. coli*. *Gene* **57**: 267-272.
- HOPPLE JR., J.S. & R. VILGALYS (1994) Phylogenetic relationships among coprinoid taxa and allies based on data from restriction site mapping of nuclear DNA. *Mycologia* **86**: 96-107.
- HORI, H. (1975) Evolution of 5S RNA. *J. Mol. Evol.* **7**: 75-86.
- HORI, H. & S. OSAWA (1987) Origin and evolution of organisms as deduced from 5S ribosomal RNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 445-472.
- HOTSON, J.W. (1927) A new species of *Exobasidium*. *Phytopathology* **17**: 207-216.
- HUELSENBECK, J.P., B. RANNALA & J.P. MASLY (2000) Accommodating phylogenetic uncertainty in evolutionary studies. *Science* **288**: 2349-2350.
- HUELSENBECK, J.P. & F. RONQUIST (2001a) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* **17**: 754-755.
- HUELSENBECK, J.P. & F. RONQUIST (2001b) *MrBayes: A Programm for the Bayesian Inference of Phylogeny*, Version 2.01.
- HUELSENBECK, J.P., B. LARGET, R.E. MILLER & F. RONQUIST (2002) Potential applications and pitfalls of Bayesian inference of phylogeny. *Syst. Biol.* **51**: 673-688.
- HULTMAN, T., S. BERGH, T. MOKS & M. UHLEN (1991) Bidirectional solid-phase sequencing of in vitro amplified plasmid DNA. *Biotechniques* **10**: 84-93.
- HUYSMANS, E., E. DAMS, A. VANDENBERGHE & R. DE WACHTER (1983) The nucleotide sequences of the 5S rRNAs of four mushrooms and their use in studying the phylogenetic position of basidiomycetes among the eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* **11**: 2871-2880.
- IJIMA, T., M. KAKISHIMA & Y. OTANI (1985) A new species of *Exobasidium* on *Cinnamomum japonicum* Sieb. *Trans. Mycol. Soc. Jpn.* **26**: 161-167.
- ING, B. (1994) *European Exobasidiales and their galls*. In: Plant Galls. Organisms, Interactions, Populations. The Systematics Association Special Volume 49 [Hrsg.: WILLIAMS, M.A.J.], S. 67-76, Clarendon Press, Oxford.
- ISSAKAINEN, J., J. JALAVA, J. SAARI & C.K. CAMPBELL (1999) Relationship of *Scedosporium prolificans* with *Petriella* confirmed by partial LSU rDNA sequences. *Mycol. Res.* **103**: 1179-1184.
- ITO, S. & K. SAWADA (1912) A new *Exobasidium*-disease of the Tea-plant. *Bot. Mag. Tokyo* **26**: 237-241.
- ITO, S. & Y. OTANI (1958) Two new species of *Exobasidium*. *Trans. Mycol. Soc. Jpn.* **VI-15**: 3-4.
- JAHNKE, K.-D. (1987) *Assessing natural relationships by DNA analysis - techniques and applications*. In: The Expanding Realm of Yeast-Like Fungi [Hrsg.: G.S., D.H., M.T. SMITH & A.C.M. WEIJMAN], S. 227-246, Amsterdam.
- JEFFREYS, A.J., V. WILSON & S.L. THEIN (1985) Individual-specific "fingerprints" of human DNA. *Nature* **316**: 76-79.
- JENG, R.S., L.C. DUCHESNE, M. SABOURRINT & M. HUBBES (1991) Mitochondrial DNA



- restriction fragment length polymorphisms of aggressive and non-aggressive isolates of *Ophiostoma ulmi*. *Mycol. Res.* **95**: 537-542.
- JUEL, H.O. (1912) Beiträge zur Kenntnis der Gattungen *Taphrina* und *Exobasidium*. *Sven. Bot. Tidskr.* **6**: 353-372.
- JUKES, T.H. & C.R. CANTOR (1969) *Evolution of protein molecules*. In: *Mammalian Protein Metabolism* [Hrsg.: MUNRO, H.N.], S. 21-132, Academic Press, New York.
- JÜLICH, W. (1981) Higher taxa of Basidiomycetes. *Bibl. Mycol.* **85**.
- JÜLICH, W. (1982) On *Exobasidium lauri*. *Int. J. Mycol. Lichenol.* **1**: 117-120.
- KÄLLERSJÖ, M., J.S. FARRIS, M.W. CHASE, B. BREMER, M.F. FAY, C.J. HUMPHRIES, G. PETERSEN, O. SEBERG & K. BREMER (1998) Simultaneous parsimony jackknife analysis of 2538 rbcL DNA sequences reveals support for major clades of green plants, land plants, seed plants and flowering plants. *Plant Syst. Evol.* **213**: 259-287.
- KARSTEN, P.A. (1882) Rysslands, Finlands och den Skandinaviska Halföns Hattsvampar, 2. *Bidrag till kännedom av Finlands natur och folk* **37**.
- KAUSERUD, H. & T. SCHUMACHER (2001) Outcrossing or inbreeding: DNA markers provide evidence for type of reproductive mode in *Phellinus nigrolimitatus* (Basidiomycota). *Mycol. Res.* **105**: 676-683.
- KHAN, S.R., J.W. KIMBROUGH & C.W. MIMS (1981) Septal ultrastructure and the taxonomy of *Exobasidium*. *Can. J. Bot.* **59**: 2450-2457.
- KIRK, P.M., P.F. CANNON, J.C. DAVID & J.A. STALPERS (2001) *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*. 9. Aufl., CABI Publishing.
- KISS, L. (1997) Genetic diversity in *Ampelomyces* isolates, hyperparasites of powdery mildew fungi, inferred from RFLP analysis of the rDNA ITS region. *Mycol. Res.* **101**: 1073-1080.
- KITCHING, I.J., P.L. FOREY, C.J. HUMPHRIES & D.M. WILLIAMS (1998) *Cladistics. The Theory and Practice of Parsimony Analysis*. 2. Aufl., Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.
- KLUGE, A.G. & J.S. FARRIS (1969) Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Syst. Zool.* **18**: 1-32.
- KO, K.S. & H.S. JUNG (1999) Molecular phylogeny of *Trametes* and related genera. *Antonie Leeuwenhoek* **75**: 191-199.
- KOTHE, E. (1996) Tetrapolar fungal mating types: sexes by the thousands. *FEMS Microbiol. Rev.* **18**: 65-87.
- KOUFOPANOU, V., A. BURT & J.W. TAYLOR (1997) Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 5478-5482.
- KOZLOWSKI, M. & P.P. STEPIEN (1982) Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of members of the genus *Aspergillus* as an aid in taxonomy. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 471-476.
- KRETZER, A.M. & T.D. BRUNS (1999) Use of atp6 in fungal phylogenetics: an example from the Boletales. *Mol. Phylogenet. Evol.* **13**: 483-492.
- KROKEN, S. & J.W. TAYLOR (2001) A gene genealogical approach to recognize phylogenetic species boundaries in the lichenized fungus *Letharia*. *Mycologia* **93**: 38-53.
- KRON, K.A. & W.S. JUDD (1990) Phylogenetic relationships within the Rhodoreae (Ericaceae) with specific comments on the placement of *Ledum*. *Syst. Bot.* **15**: 57-68.
- KRON, K.A., E.A. POWELL & J.L. LUTEYN (2002) Phylogenetic relationships within the blueberry tribe (Vaccinieae, Ericaceae) based on sequence data from matK and nuclear ribosomal ITS regions, with comments on the placement of *Satyria*. *Am. J. Bot.* **89**: 327-336.

- KUKKONEN, I. & M. RAUDASKOSKI (1964) Studies on the probable homothallism and pseudo-homothallism in the genus *Anthracoidea*. *Ann. Bot. Fenn.* **1**: 257-271.
- KUKKONEN, I. (1972) Micro- and macro-ecological factors in the speciation of obligate parasites. *Ann. Bot.* **36**: 1029-1040.
- KUKKONEN, I. & T. TIMONEN (1979) Species of Ustilaginales, especially of the genus *Anthracoidea*, as tools in plant taxonomy. *Symb. Bot. Ups.* **22**: 166-176.
- KURAISHI, H., Y. KATAYAMA-FUJIMURA, J. SUGIYAMA & T. YOKOYAMA (1985) Ubiquinone systems in fungi. I. Distribution of ubiquinones in the major families of ascomycetes, basidiomycetes, and deuteromycetes, and their taxonomic implications. *Trans. Mycol. Soc. Jpn.* **26**: 383-395.
- KURASHIGE, Y., J.-I. ETOH, T. HANDA, K. TAKAYANAGI & T. YUKAWA (2001) Sectional relationships in the genus *Rhododendron* (Ericaceae): evidence from *matK* and *trnK* intron sequences. *Plant Syst. Evol.* **228**: 1-14.
- KURTZMAN, C.P., M.J. SMILEY & C.J. JOHNSON (1980a) Emendation of the genus *Issatchenkia* Kudriavzev and comparison of species by deoxyribonucleic acid reassociation, mating reaction, and ascospore ultrastructure. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**: 503-513.
- KURTZMAN, C.P., M.J. SMILEY, C.J. JOHNSON, L.J. WICKERHAM & G.B. FUSON (1980b) Two new and closely related heterothallic species, *Pichia amylophila* and *Pichia mississippiensis*: characterization by hybridization and deoxyribonucleic acid reassociation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**: 208-216.
- KURTZMAN, C.P. (1985) *Molecular taxonomy of the fungi*. In: Gene Manipulations in Fungi [Hrsg.: BENNETT, J.W. & L.L. LASURE], S. 35-63, Academic Press, Orlando.
- KURTZMAN, C.P. & Z. LIU (1990) Evolutionary affinities of species assigned to *Lipomyces* and *Myxozyma* estimated from ribosomal RNA sequence divergence. *Curr. Microbiol.* **21**: 387-393.
- KURTZMAN, C.P. & C.J. ROBNETT (1991) Phylogenetic relationship among species of *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces* and *Schwanniomyces* determined from partial ribosomal RNA sequences. *Yeast* **7**: 61-72.
- KURTZMAN, C.P. (1993) Systematics of the ascomycetous yeasts assessed from ribosomal RNA sequence divergence. *Antonie Leeuwenhoek* **63**: 165-174.
- KURTZMAN, C.P. & C.J. ROBNETT (1994) *Orders and families of ascosporegenous yeasts and yeast-like taxa compared from ribosomal RNA sequence similarities*. In: Ascomycete Systematics. Problems and Perspectives in the Nineties. NATO ASI Series, Series A: Life Sciences Vol. 269 [Hrsg.: HAWKSWORTH, D.L.], S. 249-258, Plenum Press, New York & London.
- KURTZMAN, C.P. (1998) *Nuclear DNA hybridization: Quantitation of close genetic relationships*. In: The Yeasts, a Taxonomic Study [Hrsg.: KURTZMAN, C.P. & J.W. FELL], S. 63-68, Elsevier Science B.V., Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokyo.
- KURTZMAN, C.P. & P.A. BLANZ (1998) *Ribosomal RNA/DNA sequence comparisons for assessing phylogenetic relationships*. In: The Yeasts, a Taxonomic Study [Hrsg.: KURTZMAN, C.P. & J.W. FELL], S. 69-74, Elsevier Science B.V., Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokyo.
- KURTZMAN, C.P. & C.J. ROBNETT (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Leeuwenhoek* **73**: 331-371.
- KWOK, S., T.J. WHITE & J.W. TAYLOR (1986) Evolutionary relationships between fungi, red algae, and other simple eukaryotes inferred from total DNA hybridization to a cloned basidiomycete ribosomal DNA. *Exp. Mycol.* **10**: 196-204.

- LAASER, G. (1989) Vergleichende systematische Studien an Basidiomycetenhefen unter besonderer Berücksichtigung der Hefestadien. *Bibl. Mycol.* **130**.
- LACHANCE, M.-A. (1990) Ribosomal DNA spacer variation in the cactophilic yeast *Clavispora opuntiae*. *Mol. Biol. Evol.* **7**: 178-193.
- LAMBOWITZ, A.M. & M. BELFORT (1993) Introns as mobile genetic elements. *Annu. Rev. Biochem.* **62**: 587-622.
- LANDVIK, S., O.E. ERIKSSON, A. GARGAS & P. GUSTAFSSON (1993) Relationships of the genus *Neolecta* (Neolectales ordo nov., Ascomycotina) inferred from 18S rDNA sequences. *Syst. Ascomycetum* **11**: 107-118.
- LANE, D.J., B. PACE, G.J. OLSEN, D.A. STAHL, M.L. SOGIN & N.R. PACE (1985) Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 6955-6959.
- LAUBER, K. & G. WAGNER (1996) *Flora Helvetica*, Verlag Paul Haupt, Bern, Stuttgart, Wien.
- LAUBERT, R. (1932) *Exobasidiinae*. In: Handbuch der Pflanzenkrankheiten. Vol. 3 [Hrsg.: SORAUER, P.], S. 282-296.
- LEE, S.B. & J.W. TAYLOR (1990) *Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores*. In: PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications [Hrsg.: INNIS, M.A., D.H. GELFAND, J.J. SNINSKY & T.J. WHITE], S. 282-287, Academic Press Inc., London.
- LEE, S.B. & J.W. TAYLOR (1992) Phylogeny of five fungus-like protocistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Mol. Biol. Evol.* **9**: 636-653.
- LEMKE, T. (1994) *Grafikkonverter*, Version 2.0.
- LEMKE, T. (1998) *GraphicConverter*, Version 3.1, Release 1.98.
- LEPPIK, E.E. (1955) Evolution of angiosperms as mirrored in the phylogeny of rust fungi. *Arch. Soc. Zool. Bot. Fenn. 'Vanamo' Supplement*: 149-160.
- LEWIS, P.O. (2001) Phylogenetic systematics turns over a new leaf. *Trends Ecol. Evol.* **16**: 30-37.
- LIND, J. (1913) *Exobasidiinae*. In: Danish Fungi (as represented in the Herbarium of E. Rostrup) [Hrsg.: ROSTRUP, E.], S. 350-352, Copenhagen.
- LIU, Y., M. ROCOURT, S. PAN, C. LIU & M.J. LEIBOWITZ (1992) Sequence and variability of the 5.8S and 26S rRNA genes of *Pneumocystis carinii*. *Nucleic Acids Res.* **20**: 3763-3772.
- LIU, Y.J., S. WHELEN & B.D. HALL (1999) Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 1799-1808.
- LUMBSCH, H.T., R. LINDEMUTH & I. SCHMITT (2000) Evolution of filamentous ascomycetes inferred from LSU rDNA sequence data. *Plant Biol. (Stuttg.)* **2**: 525-529.
- MADDISON, D.R. & W.P. MADDISON (2001) *MacClade 4*, Release Version 4.03, Sinauer Associates Inc., Sunderland/Massachusetts.
- MADDISON, W.P. (1997) Gene trees in species trees. *Syst. Biol.* **46**: 523-536.
- MAGEE, B.B., T.M. D'SOUZA & P.T. MAGEE (1987) Strain and species identification by restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal DNA repeat of *Candida* species. *J. Bacteriol.* **169**: 1639-1643.
- MAIDAK, B.L., N. LARSEN, M.J. McCAUGHEY, R. OVERBEEK, G.J. OLSEN, K. FOGEL, J. BLANDY & C.R. WOESE (1994) The ribosomal database project. *Nucleic Acids Res.* **22**: 3485-3487.
- MAIDAK, B.L., J.R. COLE, T.G. LILBURN, C.T. PARKER JR., P.R. SAXMAN, R.J. FARRIS, G.M. GARRITY, G.J. OLSEN, T.M. SCHMIDT & J.M. TIEDJE (2001) The RDP-II (ribosomal database project). *Nucleic Acids Res.* **29**: 173-174.
- MAJER, D., R. MITHEN, B.G. LEWIS, P. VOS & R.P. OLIVER (1996) The use of AFLP

- fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycol. Res.* **100**: 1107-1111.
- MALAKOFF, D. (1999) Bayes offers a "new" way to make sense of numbers. *Science* **286**: 1460-1464.
- MALENÇON, G. (1953) *Le Coniodyctium chevalieri* Har. et Pat., sa nature et ses affinités. *Bull. Soc. Mycol. France* **69**: 77-100.
- MARMEISSE, R., J.C. DEBAUD & L.A. CASSELTON (1992) DNA probes for species and strain identification in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma*. *Mycol. Res.* **96**: 161-165.
- MARTINI, A. & H.J. PHAFF (1973) The optical determination of DNA-DNA homologies in yeasts. *Annali di Microbiologia (Milano)* **23**: 59-68.
- MASSE, G. (1898) Blister blight. *Kew Bull.*: 109-111.
- MATSUDA, S. & S. TAKAMATSU (2003) Evolution of host-parasite relationships of *Golovino-mycetes* (Ascomycete: Erysiphaceae) inferred from nuclear rDNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* **27**: 314-327.
- MAU, B., M.A. NEWTON & B. LARGET (1999) Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. *Biometrics* **55**: 1-12.
- MAVRIDOU, A., J. CANNONE & M.A. TYPAS (2000) Identification of group-I-introns at three different positions within the 28S rDNA gene of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Fungal Genet. Biol.* **31**: 79-90.
- MCCARTHUR, C.R. & G.D. CLARK-WALKER (1983) Mitochondrial DNA size diversity in the *Dekkera/Brettanomyces* yeasts. *Curr. Genet.* **7**: 29-35.
- MCCARROLL, R., G.J. OLSEN, Y.D. STAHL, C.R. WOESE & M.L. SOGIN (1983) Nucleotide sequence of the *Dictyostelium discoideum* small-subunit ribosomal ribonucleic acid inferred from the gene sequence: evolutionary implications. *Biochemistry* **22**: 5858-5868.
- MENABB, R.F.R. (1962) The genus *Exobasidium* in New Zealand. *Trans. R. Soc. N. Z. Bot.* **1**: 259-268.
- MENABB, R.F.R. & P.H.B. TALBOT (1973) *Holobasidiomycetidae: Exobasidiales, Brachybasidiales, Dacrymycetales, Tulasnellales*. In: *The Fungi, an Advanced Treatise*. Vol. 4B [Hrsg.: AINSWORTH, G.C., F.K. SPARROW & A.S. SUSSMAN], S. 317-325, Academic Press, New York.
- MEDLIN, L., H.J. ELWOOD, S. STICKEL & M.L. SOGIN (1988) The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene* **71**: 491-499.
- MENDONÇA-HAGLER, L.C. & H.J. PHAFF (1975) Deoxyribonucleic acid base composition and Deoxyribonucleic acid/Deoxyribonucleic acid hybrid formation in psychrophobic and related yeasts. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **25**: 222-229.
- MENDONÇA-HAGLER, L.C., A.N. HAGLER & C.P. KURTZMAN (1993) Phylogeny of *Metschnikowia* species estimated from partial rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 368-373.
- MEYER, S.A. & H.J. PHAFF (1969) Deoxyribonucleic acid base composition in yeasts. *J. Bacteriol.* **97**: 52-56.
- MEYER, W., A. KOCH, C. NIEMANN, B. BEYERMANN, J.T. EPPLER & T. BÖRNER (1991) Differentiation of species and strains among filamentous fungi by DNA fingerprinting. *Curr. Genet.* **19**: 239-242.
- MEYER, W., T.G. MITCHELL, E.Z. FREEDMAN & R. VILGALYS (1993) Hybridization probes for conventional DNA Fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 2274-2280.
- MICHEL, F. & M. COSTA (1998) *Inferring RNA structure by phylogenetic and genetic analyses*. In: *RNA Structure and Function*. Cold Spring Harbor Monograph Series 35 [Hrsg.: SIMONS, R.W. & M. GRUNBERG-MANAGO], S. 175-202, Cold Spring Harbor

Laboratory Press.

- MICHELMORE, R.W. & S.H. HULBERT (1987) Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* **25**: 383-404.
- MICHOT, B., N. HASSOUNA & H.-P. BACHELLERIE (1984) Secondary structure of mouse 28S rRNA and general model for the folding of the large rRNA in eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* **12**: 4259-4279.
- MICHOT, B. & J.-P. BACHELLERIE (1987) Comparisons of large subunit rRNAs reveal some eukaryote-specific elements of secondary structure. *Biochimie* **69**: 11-23.
- MILLER, S.L., T.M. MCCLEAN, J.F. WALKER & B. BUYCK (2001) A molecular phylogeny of the Russulales including agaricoid, gasteroid and pleurotoid taxa. *Mycologia* **93**: 344-354.
- MIMS, C.W. (1982) Ultrastructure of the haustorial apparatus of *Exobasidium camelliae*. *Mycologia* **74**: 188-200.
- MIMS, C.W. & E.A. RICHARDSON (1987) An ultrastructural study of the asexual spores of the plant pathogenic fungus *Exobasidium vaccinii*. *Bot. Gaz.* **148**: 228-234.
- MIMS, C.W., E.A. RICHARDSON & R.W. ROBERSON (1987) Ultrastructure of basidium and basidiospore development in three species of the fungus *Exobasidium*. *Can. J. Bot.* **65**: 1236-1244.
- MOKROUSOV, I.V. & S.A. BULAT (1992) Distinguishing between the biological species of the fungus *Aureobasidium pullulans* (de Bary) by the universally primed polymerase chain reaction. *Genetika SSSR* **28**: 31-38.
- MOLINA, F.I., P. SHEN & S.-C. JONG (1992) Molecular evidence supports the separation of *Lentinula edodes* from *Lentiumus* and related genera. *Can. J. Bot.* **70**: 2446-2452.
- MOLINA, F.I., P. SHEN & S.C. JONG (1993) Validation of the species concept in the genus *Dekkera* by restriction analysis of genes coding for rRNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 32-35.
- MONCALVO, J.-M., S.A. REHNER & R. VILGALYS (1993) Systematics of *Lyophyllum* section *Difformia* based on evidence from culture studies and ribosomal DNA sequences. *Mycologia* **85**: 788-794.
- MONCALVO, J.-M., H.-F. WANG & R.-S. HSEU (1995a) Gene phylogeny of the *Ganoderma lucidum* complex based on ribosomal DNA sequences. Comparison with traditional taxonomic characters. *Mycol. Res.* **99**: 1489-1499.
- MONCALVO, J.-M., H.-H. WANG & R.-S. HSEU (1995b) Phylogenetic relationship in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia* **87**: 223-238.
- MONCALVO, J.-M., D. DREHMEL & R. VILGALYS (2000) Variation in modes and rates of evolution in nuclear and mitochondrial ribosomal DNA in the mushroom genus *Amanita* (Agaricales, Basidiomycota): phylogenetic implications. *Mol. Phylogenet. Evol.* **16**: 48-63.
- MORI, Y., Y. SATO & S. TAKAMATSU (2000) Evolutionary analysis of the powdery mildew fungi using nucleotide sequences of the nuclear ribosomal DNA. *Mycologia* **92**: 74-93.
- MULLIS, K., F. FALOONA, S. SCHARF, R. SAIKI, G. HORN & H. ERLICH (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**: 263-273.
- MULLIS, K.B. & F.A. FALOONA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**: 335-350.
- MURRAY, V. (1989) Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* **17**: 8889.
- NAGAO, H., M. AKIMOTO, K. KISHI, A. EZUKA & M. KAKISHIMA (2003) *Exobasidium dubium* and *E. miyabei* sp. nov. causing *Exobasidium* leaf blisters on *Rhododendron* spp. in Japan.

- Mycoscience* **44**: 1-9.
- NAKASE, T. & K. KOMAGATA (1968) Taxonomic significance of base composition of yeast DNA. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **14**: 345-357.
- NAKASE, T. & K. KOMAGATA (1971) Significance of DNA base composition in the classification of yeast genus *Candida*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **17**: 259-279.
- NANFELDT, J.A. (1979) *Anthracoidea* (Ustilaginales) on nordic Cyperaceae-Caricoideae, a concluding synopsis. *Symb. Bot. Ups.* **22**.
- NANFELDT, J.A. (1981) *Exobasidium*, a taxonomic reassessment applied to the European species. *Symb. Bot. Ups.* **23**.
- NATH, K. & A.P. BOLLON (1977) Organization of the yeast ribosomal RNA gene cluster via cloning and restriction analysis. *J. Biol. Chem.* **252**: 6562-6571.
- NATHANS, D. & H.O. SMITH (1975) Restriction endonucleases in the analysis and reconstructing of DNA molecules. *Annu. Rev. Biochem.* **44**: 273-293.
- NEI, M. & W.-H. LI (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 5269-5273.
- NEUVÉGLISE, C., Y. BRYGOO, B. VERCAMBRE & G. RIBA (1994) Comparative analysis of molecular and biological characteristics of strains of *Beauveria brongniartii* isolated from insects. *Mycol. Res.* **98**: 322-328.
- NEUVÉGLISE, C., Y. BRYGOO & G. RIBA (1997) 28S rDNA group-I introns: a powerful tool for identifying strains of *Beauveria brongniartii*. *Mol. Ecol.* **6**: 373-381.
- NICKERSON, N.L. (1984) A previously unreported disease of cranberries caused by *Exobasidium perenne* sp. nov. *Can. J. Plant Pathol.* **6**: 218-220.
- NICKERSON, N.L. & S.P. VANDER KLOET (1997) *Exobasidium* leaf spot of lowbush blueberry. *Can. J. Plant Pathol.* **19**: 66-68.
- NISHIDA, H. & J. SUGIYAMA (1993) Phylogenetic relationships among *Taphrina*, *Saitoella*, and other higher fungi. *Mol. Biol. Evol.* **10**: 431-436.
- NISHIDA, H., K. ANDO, Y. ANDO, A. HIRATA & J. SUGIYAMA (1995) *Mixia osmundae*: transfer from the Ascomycota to the Basidiomycota based on evidence from molecules and morphology. *Can. J. Bot.* **73**: S660-S666.
- NISSEN, P., J. HANSEN, N. BAN, P.B. MOORE & T.A. STEITZ (2000) The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* **289**: 920-930.
- NÖLLER, H.F., J.A. KOP, V. WHEATON, J. BROSIUS, R.R. GUTELL, A.M. KOPYLOV, F. DOHME & W. HERR (1981) Secondary structure model for 23S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* **9**: 6167-6189.
- NOMENCLATURE COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY (1985) Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences - recommendations 1984. *Eur. J. Biochem.* **150**: 1-5.
- O'DONNELL, K. (1992) Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). *Curr. Genet.* **22**: 213-220.
- O'DONNELL, K. & E. CIGELNIK (1997) Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phylogenet. Evol.* **7**: 103-116.
- O'DONNELL, K., F.M. LUTZONI, T.J. WARD & G.L. BENNY (2001) Evolutionary relationships among mucoralean fungi (Zygomycota): evidence for family polyphyly on a large scale. *Mycologia* **93**: 286-296.
- OBERWINKLER, F. (1978) Was ist ein Basidiomycet? *Z. Mykol.* **44**: 13-29.

- OBERWINKLER, F. (1982) *The significance of the morphology of the basidium in the phylogeny of basidiomycetes*. In: Basidium and Basidiocarp. Evolution, Cytology, Function, and Development [Hrsg.: WELLS, K. & E.K. WELLS], S. 9-35, New York, Heidelberg, Berlin.
- OBERWINKLER, F., R.J. BANDONI, P.A. BLANZ, G. DEML & L. KISIMOVA-HOROVITZ (1982) Graphiolales: basidiomycetes parasitic on palms. *Plant Syst. Evol.* **140**: 251-277.
- OBERWINKLER, F. (1987) *Heterobasidiomycetes with ontogenetic yeast-stages - systematic and phylogenetic aspects*. In: The Expanding Realm of Yeast-Like Fungi [Hrsg.: DE HOOG, G.S., M.T. SMITH & A.C.M. WEIJMAN], S. 61-74, Amsterdam.
- OLSEN, G.J., D.J. LANE, S.J. GIOVANNONI & N.R. PACE (1986) Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.* **40**: 337-365.
- OLSEN, G.J. (1990) *Sequence Editing and Analysis Program*, Version 3.0.0, 9.11.1990.
- OTANI, Y. (1976) A new species of *Exobasidium* collected in Iriomote-Island, Okinawa. *Trans. Mycol. Soc. Jpn.* **17**: 355-357.
- PAGE, R.D.M. & M.A. CHARLESTON (1998) Trees within trees: phylogeny and historical associations. *Trends Ecol. Evol.* **13**: 356-359.
- PAGE, R.D.M. & E.C. HOLMES (1998) *Molecular Evolution. A Phylogenetic Approach*, Blackwell Scientific Ltd, Oxford.
- PAGE, R.D.M. (2000) *TreeView PPC*, Version 1.6.2.
- PAMILO, P. & M. NEI (1988) Relationship between gene trees and species trees. *Mol. Biol. Evol.* **5**: 568-583.
- PANTOU, M.P., A. MAVRIDOU & M.A. TYPAS (2003) IGS sequence variation, group-I-introns and the complete nuclear ribosomal DNA of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*: excellent tool for isolate detection and phylogenetic analysis. *Fungal Genet. Biol.* **38**: 159-174.
- PARLEVLIET, J.E. (1986) *Coevolution of host resistance and pathogen virulence: possible implications for taxonomy*. In: Coevolution and Systematics. The Systematics Association Special Volume 32 [Hrsg.: STONE, A.R. & D.L. HAWKSWORTH], S. 19-34, Clarendon Press, Oxford.
- PAULE, M.R. (1998) *Class I genes*. In: Transcription of Ribosomal RNA Genes by Eukaryotic RNA Polymerase I [Hrsg.: PAULE, M.R.], S. 1-8, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- PAULUS, B., N. HALLENBERG, P.K. BUCHANAN & G.K. CHAMBERS (2000) A phylogenetic study of the genus *Schizopora* (Basidiomycota) based on ITS DNA sequences. *Mycol. Res.* **104**: 1155-1163.
- PEATTIE, D.A. (1979) Direct chemical method for sequencing RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 1760-1764.
- PERKIN ELMER CORPORATION [Hrsg.] (1990) *Biotechnology Catalog. GenAmp PCR DNA Amplification*.
- PERLMAN, P.S., C.L. PEEBLES & C. DANIELS (1990) *Different types of introns and splicing mechanisms*. In: Intervening Sequences in Evolution and Development [Hrsg.: STONE, E.M. & R.J. SCHWAETZ], S. 112-161, Oxford University Press, New York.
- PETERSON, S.W. & A. LOGRIECO (1991) Ribosomal RNA sequence variation among interfertile strains of some *Gibberella* species. *Mycologia* **83**: 397-402.
- PHARMACIA BIOTECH (1995) *ALF Manager*, Version 3.01.
- PIPE, N.D., K.W. BUCK & C.M. BRASIER (1995) Genomic fingerprinting supports the separation of *Ophiostoma piceae* into two species. *Mycol. Res.* **99**: 1182-1186.
- PRICE, C.W., G.B. FUSON & H.J. PHAFF (1978) Genome comparison in yeast systematics: delimitation of species within the genera *Schwanniomyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces*,

- and *Pichia*. *Microbiol. Rev.* **42**: 161-193.
- PRILLINGER, H., C. DÖRFLER, G. LAASER, B. ECKERLEIN & L. LEHLE (1990a) Ein Beitrag zur Systematik und Entwicklungsbiologie Höherer Pilze: Hefe-Typen der Basidiomyceten. Teil I Schizosaccharomycetales, *Protomyces*-Typ. *Z. Mykol.* **56**: 219-250.
- PRILLINGER, H., C. DÖRFLER, G. LAASER & G. HAUSKA (1990b) Ein Beitrag zur Systematik und Entwicklungsbiologie Höherer Pilze: Hefe-Typen der Basidiomyceten. Teil III *Ustilago*-Typ. *Z. Mykol.* **56**: 251-278.
- PRILLINGER, H., F. OBERWINKLER, C. UMILE, K. TLACHAC, R. BAUER, C. DÖRFLER & E. TAUFRAZTHOFER (1993) Analysis of cell wall carbohydrates (neutral sugars) from ascomycetous and basidiomycetous yeasts with and without derivatization. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **39**: 1-34.
- PRITSCH, K., H. BOYLE, J.C. MUNCH & F. BUSCOT (1997) Characterization and identification of black alder ectomycorrhizas by PCR/RFLP analyses of the rDNA internal transcribed spacer (ITS). *New Phytol.* **137**: 357-369.
- PRYOR, B.M. & R.L. GILBERTSON (2000) Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. *Mycol. Res.* **104**: 1312-1321.
- PURVIS, A. & P.-M. AGAPOW (2002) Phylogeny imbalance: taxonomic level matters. *Syst. Biol.* **51**: 844-854.
- QU, L.H., B. MICHOT & J.-P. BACHELLERIE (1983) Improved methods for structure probing in large RNAs: a rapid 'heterologous' sequencing approach is coupled to the direct mapping of nuclease accessible sites. Application to the 5' terminal domain of eukaryotic 28S rRNA. *Nucleic Acids Res.* **11**: 5903-5920.
- RACIBORSKI, M. (1900) *Parasitische Algen und Pilze Java's*, Botanisches Institut zu Buitenzorg, Batavia Staatsdruckerei (Reprint 1973 als Vol. 37 in Bibl. Mycol., Verlag von J. Cramer).
- RAJENDREN, R.B. (1968) *Muribasidiospora* - a new genus of the Exobasidiaceae. *Mycopathol. Mycol. Appl.* **36**: 218-222.
- RAKOTONIRAINY, M.S., M.L. CARIOU, Y. BRYGOO & G. RIBA (1994) Phylogenetic relationships within the genus *Metarhizium* based on 28S rRNA sequences and isozyme comparison. *Mycol. Res.* **98**: 225-230.
- RANNALA, B. & Z. YANG (1996) Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *J. Mol. Evol.* **43**: 304-311.
- RAUÉ, H.A., J. KLOOTWIJK & W. MUSTERS (1988) Evolutionary conservation of structure and function of high molecular weight ribosomal RNA. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **51**: 77-129.
- RICHARDS, H.M. (1896) Notes on cultures of *Exobasidium andromedae* and of *Exobasidium vaccinii*. *Bot. Gaz.* **21**: 101-108.
- ROGERS, S.O. & A.J. BENDICH (1985) Extraction of DNA from miligram amount of fresh, herbarium and mummified plant tissue. *Plant Mol. Biol.* **5**: 69-76.
- ROGERS, S.O., Z.H. YAN, M. SHINOHARA, K.F. LOBUGLIO & C.J.K. WANG (1993) Messenger RNA intron in the nuclear 18S ribosomal RNA gene of deuteromycetes. *Curr. Genet.* **23**: 338-342.
- ROHLF, F.J. (1993) *NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*, Version 1.80 (DOS), Applied Biostatistics Inc. (Exeter Publishing Ltd.), New York.
- ROSTRUP, E. (1885) Om nogle af snyltesvampe foraarsagede misdannelser hos blomsterplanter. *Bot. Tidsskr.* **14**: 230-240.
- ROY, B.A. (2001) Patterns of association between crucifers and their flowering-mimic pathogens: host jumps are more common than coevolution or cospeciation. *Evolution* **55**:



41-53.

- ROYAL BOTANIC GARDENS KEW (1997) *Index Kewensis*, Version 2.0 (Februar 1997), CD-Rom, Oxford University Press, Electronic Publishing, Oxford.
- RUBIN, G.M. (1973) The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* 5.8S ribosomal ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* **248**: 3860-3875.
- RUBTSOV, P.M., M.M. MUSAKHANOV, V.M. ZAKHARYEV, A.S. KRAYEV, K.G. SKRYABIN & A.A. BAYEV (1980) The structure of the yeast ribosomal RNA genes. I. The complete nucleotide sequence of the 18S ribosomal RNA gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **8**: 5779-5794.
- SACCARDO, P.A. & A. TROTTER (1912) *Supplementum Universale, Pars VIII. Hymenomycetae - Phycomycetae*. In: *Sylloge Fungorum Omnium Hucusque Cognitorum*. Vol. XXI [Hrsg.: SACCARDO, P.A.], Patavii.
- SACCARDO, P.A. (1917) Pugilillo di Funghi della Val d'Aosta. *Nuovo Giornale Botanico Italiano Nuova Serie* **24**: 31-43.
- SAENZ, G.S., J.W. TAYLOR & A. GARGAS (1994) 18S rRNA gene sequences and supraordinal classification of the Erysiphales. *Mycologia* **86**: 212-216.
- SAIKI, R.K., S. SCHARF, F. FALOONA, K.B. MULLIS, G.T. HORN, H.A. ERLICH & N. ARNHEIM (1985) Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- SAIKI, R.K., D.H. GELFAND, S. STOFFEL, S.J. SCHARF, R. HIGUCHI, G.T. HORN, K.B. MULLIS & H.A. ERLICH (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostabile DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- SAITOU, N. & M. NEI (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH & T. MANIATIS (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory.
- SANGER, F., S. NICKLEN & A.R. COULSON (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- SAVILE, D.B.O. (1955) A phylogeny of the basidiomycetes. *Can. J. Bot.* **33**: 60-104.
- SAVILE, D.B.O. (1959a) Notes on *Exobasidium*. *Can. J. Bot.* **37**: 641-656.
- SAVILE, D.B.O. (1959b) The botany of Somerset Island, District of Franklin. *Can. J. Bot.* **37**: 959-1002.
- SAVILE, D.B.O. (1961) *Evolution of Saxifragaceae from a mycologist's viewpoint*. In: *Recent Advances in Botany*. Vol. 1, S. 169-172.
- SAVILE, D.B.O. (1979) Fungi as aids in higher plant classification. *Bot. Rev.* **45**: 377-503.
- SCHÜBLER, A., D. SCHWARZOTT & C. WALKER (2001) A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* **105**: 1413-1421.
- SHEAR, C.L. (1907) Cranberry diseases. *U.S. Dept. Agric., Bureau Plant Industry Bulletin* **110**.
- SHEN, P., S.-C. JONG & F.I. MOLINA (1994) Analysis of ribosomal DNA restriction patterns in the genus *Kluyveromyces*. *Antonie Leeuwenhoek* **65**: 99-105.
- SHIRAI, M. (1896) Descriptions of some new Japanese species of *Exobasidium*. *Bot. Mag. Tokyo* **10**: 51-54.
- SIEGMUND, W. (1879) Studie über die Brand- und Rostpilze der Umgebung Reichenbergs in Böhmen. *Mitteilungen des Verein der Naturfreunde Reichenberg*: 5-27.
- SNEATH, P.H.A. & R.R. SOKAL (1973) *Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification*, W.H. Freeman and Company, San Francisco.

- SNETSelaar, K.M. & C.W. MIMS (1992) Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia* **84**: 193-203.
- SOGIN, M.L. & J.H. GUNDERSON (1987) Structural diversity of eukaryotic small subunit ribosomal RNA. Evolutionary implications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **503**: 125-139.
- SOGIN, M.L. & J.C. EDMAN (1989) A self-splicing intron in the small subunit rRNA gene of *Pneumocystis carinii*. *Nucleic Acids Res.* **17**: 5349-5359.
- SOGIN, M.L., J.H. GUNDERSON, H.J. ELWOOD, R.A. ALONSO & D.A. PEATTIE (1989) Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. *Science* **243**: 75-77.
- SOGIN, M.L. (1994) *The origin of eukaryotes and evolution into major kingdoms*. In: Early Life on Earth. Nobel Symposium No. 84 [Hrsg.: BENGTSON, S.], S. 181-192, Columbia University Press, New York.
- SOKAL, R.R. & C.D. MICHENER (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kans. Sci. Bull.* **38**: 1409-1438.
- SOKAL, R.R. & F.J. ROHLF (1962) The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon* **11**: 33-40.
- SOLTIS, D.E., P.S. SOLTIS, M.W. CHASE, M.E. MORT, D.C. ALBACH, M. ZANIS, V. SAVOLAINEN, W.H. HAHN, S.B. HOOT, M.F. FAY, M. AXTELL, S.M. SWENSEN, L.M. PRINCE, W.J. KRESS, K.C. NIXON & J.S. FARRIS (2000) Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, rbcL, and atpB sequences. *Bot. J. Linn. Soc.* **133**: 381-461.
- SPATAFORA, J.W. & M. BLACKWELL (1993) Molecular systematics of unitunicate perithecial ascomycetes: the Clavicipitales-Hypocreales connection. *Mycologia* **85**: 912-922.
- SPELLIG, T., E. REGENFELDER, M. REICHMANN, F. SCHAUWECKER, R. BOHLMANN, M. URBAN, M. BÖLKER, J. KÄMPER & R. KAHMANN (1994) Control of mating and development in *Ustilago maydis*. *Antonie Leeuwenhoek* **65**: 191-197.
- SPENCER, D.F., M.N. SCHNARE & M.W. GRAY (1984) Pronounced structural similarities between the small subunit ribosomal RNA genes of wheat mitochondria and *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 493-497.
- STEENKAMP, E.T., B.D. WINGFIELD, A.E. DESJARDINS, W.F.O. MARASAS & M.J. WINGFIELD (2002) Cryptic speciation in *Fusarium subglutinans*. *Mycologia* **94**: 1032-1043.
- STENDERUP, A. & A.L. BAK (1968) Deoxyribonucleic acid base composition of some species within the genus *Candida*. *J. Gen. Microbiol.* **52**: 231-236.
- STEVANEcz, E. (1998) *Exon- und Intron-Nukleotidsequenzen des 26S rRNA-Gens der Gattung Exobasidium (Basidiomycota) und ihre Verwendung als systematisches Merkmal*. Diplomarbeit, Karl-Franzens-Universität Graz.
- STEWART, E.L., Z. LIU, P.W. CROUS & L.J. SZABO (1999) Phylogenetic relationships among some cercosporoid anamorphs of *Mycosphaerella* based on rDNA sequence analysis. *Mycol. Res.* **103**: 1491-1499.
- STOESSER, G., W. BAKER, A. VAN DEN BROEK, E. CAMON, M. GARCIA-PASTOR, C. KANZ, T. KULIKOVA, R. LEINONEN, Q. LIN, V. LOMBARD, R. LOPEZ, N. REDASCHI, P. STOEHR, M.A. TULI, K. TZOUVARA & R. VAUGHAN (2002) The EMBL nucleotide sequence database. *Nucleic Acids Res.* **30**: 21-26.
- STORCK, R. (1966) Nucleotide composition of nucleic acids in fungi. II Deoxyribonucleic acids. *J. Bacteriol.* **91**: 227-230.
- STORCK, R. & C.J. ALEXOPOULOS (1970) Deoxyribonucleic acid of fungi. *Bacteriol. Rev.* **34**: 126-154.
- STRASBURGER, E., F. NOLL, H. SCHENCK & A.F.W. SCHIMPER (1998) *Lehrbuch der Botanik*. Bearbeitet von P. Sitte, H. Ziegler, F. Ehrendorfer & A. Bresinsky, 34. Aufl., Gustav

Fischer Verlag, Stuttgart.

- SUGITA, T., A. NISHIKAWA, R. IKEDA & T. SHINODA (1999) Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1985-1993.
- SUGITA, T., M. TAKASHIMA, N. POONWAN, N. MEKHA, K. MALAITHAO, B. THUNG MUTHASAWAT, S. PRASARN, P. LUANGSOOK & T. KUDO (2003) The first isolation of ustilaginomycetous anamorphic yeasts, *Pseudozyma* species, from patients' blood and a description of two new species: *P. parantarctica* and *P. thailandica*. *Microbiol. Immunol.* **47**: 183-190.
- SUGIYAMA, J., M. FUKAGAWA, S.-W. CHIU & K. KOMAGATA (1985) Cellular carbohydrate composition, DNA base composition, ubiquinone systems, and diazonium blue B color test in the genera *Rhodosporeidium*, *Leucosporeidium*, *Rhodotorula* and related basidiomycetous yeast. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **31**: 519-550.
- SUGIYAMA, J., M. ITOH, Y. KATAYAMA, Y. YAMAOKA, K. ANDO, M. KAKISHIMA & H. KURAISHI (1988) Ubiquinone systems in fungi. II. Distribution of ubiquinones in smut and rust fungi. *Mycologia* **80**: 115-120.
- SUGIYAMA, J. & S.-O. SUH (1993) Phylogenetic analysis of basidiomycetous yeasts by means of 18S ribosomal RNA sequences: relationship of *Erythrobasidium hasegawianum* and other basidiomycetous yeast taxa. *Antonie Leeuwenhoek* **63**: 201-209.
- SUNDSTRÖM, K.-R. (1964) Studies of the physiology, morphology and serology of *Exobasidium*. *Symb. Bot. Ups.* **18**.
- SWANN, E.C. & J.W. TAYLOR (1993) Higher taxa of basidiomycetes: an 18S rRNA gene perspective. *Mycologia* **85**: 923-936.
- SWANN, E.C. & J.W. TAYLOR (1995a) Phylogenetic diversity of yeast-producing basidiomycetes. *Mycol. Res.* **99**: 1205-1210.
- SWANN, E.C. & J.W. TAYLOR (1995b) Phylogenetic perspectives on basidiomycete systematics: evidence from the 18S rRNA gene. *Can. J. Bot.* **73**: S862-S868.
- SWANN, E.C., E.M. FRIEDERS & D.J. MCLAUGHLIN (1999) *Microbotryum*, *Kriegeria* and the changing paradigm in basidiomycete classification. *Mycologia* **91**: 51-66.
- SWOFFORD, D.L. & G.J. OLSEN (1990) *Phylogeny reconstruction*. In: Molecular Systematics [Hrsg.: HILLIS, D.M. & C. MORITZ], S. 411-501, Sinauer Associates Inc., Sunderland/Massachusetts.
- SWOFFORD, D.L. (1993) *PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony*, Version 3.1.1, Smithsonian Institution, Washington.
- SWOFFORD, D.L., G.J. OLSEN, P.J. WADDELL & D.M. HILLIS (1996) *Phylogenetic inference*. In: Molecular Systematics [Hrsg.: HILLIS, D.M., C. MORITZ & B.K. MABLE], S. 407-514, Sinauer Associates Inc., Sunderland/Massachusetts.
- SWOFFORD, D.L. (1999) *PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\* and other methods)*, Version 4.0 beta (4.0b2), Sinauer Associates Inc., Sunderland/Massachusetts.
- SWOFFORD, D.L. (2002) *PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\* and other methods)*, Version 4.0 beta (4.0b10), Sinauer Associates Inc., Sunderland/Massachusetts.
- TABERLET, P., L. GIELLY, G. PAUTOU & J. BOUVET (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* **17**: 1105-1109.
- TAKASHIMA, M. & T. NAKASE (1996) A phylogenetic study of the genus *Tilletiopsis*, *Tilletiaria anomala* and related taxa based on the small subunit ribosomal DNA sequences. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **42**: 421-429.
- TAN, M.K. (1997) Origin and inheritance of group I introns in 26S rRNA genes of *Gaeumannomyces graminis*. *J. Mol. Evol.* **44**: 637-645.

- TANABE, Y., A. YOKOTA & J. SUGIYAMA (2002) Group I introns from Zygomycota: evolutionary implications for the fungal IC1 intron subgroup. *J. Mol. Evol.* **54**: 692-702.
- TAYLOR, J.W., B.D. SMOLICH & G. MAY (1986) Evolution and mitochondrial DNA in *Neurospora crassa*. *Evolution* **40**: 716-739.
- TAYLOR, J.W. & D.O. NATVIG (1987) *Isolation of fungal DNA*. In: Zoosporic Fungi in Teaching and Research [Hrsg.: FULLER, M.S. & A. JAWORSKI], S. 252-258, Athen.
- TAYLOR, J.W., D.J. JACOBSON, S. KROKEN, T. KASUGA, D.M. GEISER, D.S. HIBBETT & M.C. FISHER (2000) Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet. Biol.* **31**: 21-32.
- TEHLER, A., J.S. FARRIS, D.L. LIPSCOMB & M. KÄLLERSJÖ (2000) Phylogenetic analyses of the fungi based on large rDNA data sets. *Mycologia* **92**: 459-474.
- TEHLER, A., D.P. LITTLE & J.S. FARRIS (2003) The full-length phylogenetic tree from 1551 ribosomal sequences of chitinous fungi, Fungi. *Mycol. Res.* **107**: 901-916.
- TEMPLETON, A.R. (1983) *Convergent evolution and non-parametric inferences from restriction data and DNA sequences*. In: Statistical Analysis of DNA Sequence Data [Hrsg.: WEIR, B.], S. 151-179, Marcel Dekker, New York.
- THOMAS, F. (1877) Mittheilungen zur Phanerogamen- und Pilzflora von Thüringen. *Zeitschrift für die gesamten Naturwissenschaften* **49 (3. Folge 1)**: 516-518.
- THOMAS, F. (1897) Über einige Exobasidien und Exoasceen. *Forstlich-Naturwissenschaftliche Zeitschrift (München)* **6**: 305-314.
- THON, M.R. & D.J. ROYSE (1999) Partial  $\beta$ -tubulin gene sequences for evolutionary studies in the Basidiomycotina. *Mycologia* **91**: 468-474.
- TILLIER, E.R.M. & R.A. COLLINS (1995) Neighbor joining and maximum likelihood with RNA sequences: Addressing the interdependence of sites. *Mol. Biol. Evol.* **12**: 7-15.
- TOURASSE, N.J. & M. GOUY (1999) Accounting for evolutionary rate variation among sequence sites consistently changes universal phylogenies deduced from rRNA and protein-coding genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* **13**: 159-168.
- UNSELD, M.G. (1988) *Vergleichende Sequenzanalyse von Teilbereichen der 18S und 28S ribosomalen RNAs bei Niederen Eukaryonten*. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- UPHOLT, W.B. (1977) Estimation of DNA sequence divergence from comparison of restriction endonuclease digests. *Nucleic Acids Res.* **4**: 1257-1265.
- VAN BELKUM, A., W.G.V. QUINT, B.E. DE PAUW, W.J.G. MELCHERS & J.F. MEIS (1993) Typing of *Aspergillus* species and *Aspergillus fumigatus* isolates by interrepeat polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 2502-2505.
- VAN DE PEER, Y., L. HENDRIKS, A. GORIS, J.-M. NEEFS, M. VANCANNEYT, K. KERSTERS, J.-F. BERNY, G.L. HENNEBERT & R. DE WACHTER (1992a) Evolution of basidiomycetous yeasts as deduced from small ribosomal subunit RNA sequences. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**: 250-258.
- VAN DE PEER, Y., J.-M. NEEFS, P. DE RIJK, R. DE BAERE, A. GORIS, L. HENDRIKS & R. DE WACHTER (1992b) Ribosomal RNA as a tool for studying evolution. *Belg. J. Bot.* **125**: 174-190.
- VAN DE PEER, Y., S. CHAPPELLE & R. DE WACHTER (1996) A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial RNA. *Nucleic Acids Res.* **24**: 3381-3391.
- VAN DE PEER, Y. & R. DE WACHTER (1997) Evolutionary relationships among the eukaryotic crown taxa taking into account site-to-site rate variation in 18S rRNA. *J. Mol. Evol.* **45**: 619-630.
- VAN DE PEER, Y., J. JANSEN, P. DE RIJK & R. DE WACHTER (1997) Database of the structure of

- small ribosomal subunit RNA. *Nucleic Acids Res.* **25**: 111-116.
- VAN DE PEER, Y., S.L. BALDAUF, W.F. DOOLITTLE & A. MEYER (2000) An updated and comprehensive rRNA phylogeny of (crown) eukaryotes based on rate-calibrated evolutionary distances. *J. Mol. Evol.* **51**: 565-576.
- VAN DER WALT, J.P. & E. JOHANNSEN (1979) A comparison of interfertility and in vitro DNA-DNA reassociation as criteria for speciation in the genus *Kluyveromyces*. *Antonie Leeuwenhoek* **45**: 281-291.
- VANDAMME, P., B. POT, M. GILLIS, P. DE VOS, K. KERSTERS & J. SWINGS (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **June**: 407-438.
- VÁNKY, K. (1979) Species concept in *Anthracoidea* (Ustilaginales) and some new species. *Bot. Not.* **132**: 221-231.
- VILGALYS, R. & D. GONZALEZ (1990a) Ribosomal DNA restriction fragment length polymorphisms in *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* **80**: 151-158.
- VILGALYS, R. & D. GONZALEZ (1990b) Organization of ribosomal DNA in the basidiomycete *Thanatephorus praticola*. *Curr. Genet.* **18**: 277-280.
- VILGALYS, R. & M. HESTER (1990) Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J. Bacteriol.* **172**: 4238-4246.
- VON ARX, J.A. & A.C.M. WEIJMAN (1979) Conidiation and carbohydrate composition in some *Candida* and *Torulopsis* species. *Antonie Leeuwenhoek* **45**: 547-555.
- VOS, P., R. HOGERS, M. BLEEKER, M. REIJANS, T. VAN DE LEE, M. HORNES, A. FRIJTERS, J. POT, J. PELEMAN, M. KUIPER & M. ZABEAU (1995) AFLP: a new technique of DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **23**: 4407-4414.
- WÄGELE, J.-W. (2001) *Grundlagen der phylogenetischen Systematik*. 2. Aufl., Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München.
- WAGNER, T. & M. FISCHER (2001) Natural groups and a revised system for the European poroid Hymenochaetales (Basidiomycota) supported by nLSU rDNA sequence data. *Mycol. Res.* **107**: 773-782.
- WALKER, W.F. & W.F. DOOLITTLE (1982) Redividing the basidiomycetes on the basis of 5S rRNA sequences. *Nature* **299**: 723-724.
- WALKER, W.F. & W.F. DOOLITTLE (1983) 5S rRNA sequences from eight basidiomycetes and fungi imperfecti. *Nucleic Acids Res.* **11**: 7625-7630.
- WALKER, W.F. (1984) 5S rRNA sequences from Atractiellales, and basidiomycetous yeasts and fungi imperfecti. *Syst. Appl. Microbiol.* **5**: 352-359.
- WALKER, W.F. (1985) 5S and 5.8S ribosomal RNA sequences and protist phylogenetics. *Biosystems* **18**: 269-278.
- WARD, E. & A.Y. AKROFI (1994) Identification of fungi in the *Gaeumannomyces-Phialophora* complex by RFLPs of PCR-amplified ribosomal DNAs. *Mycol. Res.* **98**: 219-224.
- WARNER, J.R. (1989) Synthesis of ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **53**: 256-271.
- WEDIN, M. & L. TIBELL (1997) Phylogeny and evolution of Caliciaceae, Mycocaliciaceae, and Sphinctrinaceae (Ascomycota) with notes on the evolution of the prototunicate ascus. *Can. J. Bot.* **75**: 1236-1242.
- WEDIN, M., H. DÖRING & S. EKMAN (2000) Molecular phylogeny of the lichen families Cladoniaceae, Sphaerophoraceae, and Stereocaulaceae (Lecanorales, Ascomycotina). *Lichenologist* **32**: 171-187.
- WEIJMAN, A.C.M. & G.S. DE HOOG (1975) On the subdivision of the genus *Ceratocystis*. *Antonie Leeuwenhoek* **41**: 353-360.

- WEIJMAN, A.C.M. & L. RODRIGUES DE MIRANDA (1983) Xylose distribution within and taxonomy of the genera *Bullera* and *Sporobolomyces*. *Antonie Leeuwenhoek* **49**: 559-562.
- WEIJMAN, A.C.M. & W.I. GOLUBEV (1987) *Carbohydrate patterns and taxonomy of yeasts and yeast-like fungi*. In: The Expanding Realm of Yeast-Like Fungi [Hrsg.: DE HOOG, G.S., M.T. SMITH & A.C.M. WEIJMAN], S. 361-371, Amsterdam.
- WEISING, K., H. NYBOM, K. WOLFF & W. MEYER (1995) *DNA Fingerprinting in Plants and Fungi*, CRC Press, London.
- WEIß, M., Z.-L. YANG & F. OBERWINKLER (1998) Molecular phylogenetic studies in the genus *Amanita*. *Can. J. Bot.* **76**: 1170-1179.
- WEIß, M. & F. OBERWINKLER (2001) Phylogenetic relationships in Auriculariales and related groups - hypotheses derived from nuclear ribosomal DNA sequences. *Mycol. Res.* **105**: 403-415.
- WELSH, J. & M. MCCLELLAND (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* **18**: 7213-7218.
- WHEELER, W. (1999) Fixed character states and the optimization of molecular sequence data. *Cladistics* **15**.
- WHEELER, W.C. & R.L. HONEYCUTT (1988) Paired sequence difference in ribosomal RNAs: evolutionary and phylogenetic implications. *Mol. Biol. Evol.* **5**: 90-96.
- WHITE, R.J. (1998) *RNA Polymerase III Transcription (Kapitel 1: Class III Genes)*. 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- WHITE, T.J., N. ARNHEIM & H.A. ERLICH (1989) The polymerase chain reaction. *Trends Genet.* **5**: 185-189.
- WHITE, T.J., T. BRUNS, S. LEE & J. TAYLOR (1990) *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In: PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications [Hrsg.: INNIS, M.A., D.H. GELFAND, J.J. SNINSKY & T.J. WHITE], S. 315-322, Academic Press, Inc., London.
- WILLIAMS, G.K., A.R. KUBELIK, K.J. LIVAK, J.A. RAFALSKI & S.V. TINGEY (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6531-6535.
- WILLIAMSON, J.R. (2000) Small subunit, big science. *Nature* **407**: 306-307.
- WILMOTTE, A., Y. VAN DE PEER, A. GORIS, S. CHAPELLE, R. DE BAERE, B. NELISSEN, J.-M. NEEFS, G.L. HENNEBERT & R. DE WACHTER (1993) Evolutionary relationships among higher fungi inferred from small ribosomal subunit RNA sequence analysis. *Syst. Appl. Microbiol.* **16**: 436-444.
- WIMBERLY, B.T., D.E. BRODERSEN, W.M. CLEMONS, R.J. MORGAN-WARREN, A.P. CARTER, C. VONRHEIN, T. HARTSCH & V. RAMAKRISHNAN (2000) Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* **407**: 327-339.
- WINGFIELD, B.D., C.D. VILJOEN & M.J. WINGFIELD (1999) Phylogenetic relationships of ophiostomatoid fungi associated with *Protea infructescences* in South Africa. *Mycol. Res.* **103**: 1616-1620.
- WOESE, C.R., R. GUTELL, R. GUPTA & H.F. NOLLER (1983) Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids. *Microbiol. Rev.* **47**: 621-669.
- WOESE, C.R. & N.R. PACE (1993) *Probing RNA structure, function, and history by comparative analysis*. In: The RNA World. Cold Spring Harbor Monograph Series 24 [Hrsg.: GESTELAND, R.F. & J.F. ATKINS], S. 91-117, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- WOLF, F.T. & F.A. WOLF (1952) Pathology of *Camellia* leaves infected by *Exobasidium camelliae* var. *gracilis* Shirai. *Phytopathology* **42**: 147-149.
- WORONIN, M. (1867) *Exobasidium vaccinii*. *Ber. Naturf. Ges. Freiburg* **4**: 397-416.

- WUYTS, J., P. DE RIJK, Y. VAN DE PEER, T. WINKELMANS & R. DE WACHTER (2001) The European large subunit ribosomal RNA database. *Nucleic Acids Res.* **29**: 175-177.
- WUYTS, J., Y. VAN DE PEER, T. WINKELMANS & R. DE WACHTER (2002) The European database on small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* **30**: 183-185.
- YAMADA, Y. & K. KONDO (1973) Coenzyme Q system in the classification of the yeast genera *Rhodotorula* and *Cryptococcus*, and the yeast-like genera *Sporobolomyces* and *Rhodospiridium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **19**: 59-77.
- YAMADA, Y., T. OISHI & K. KONDO (1983) The coenzyme Q system in strains of yeasts and yeast-like fungi. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **29**: 51-57.
- YAMADA, Y., I. BANNO, J.A. VON ARX & J.P. VAN DER WALT (1987) *Taxonomic significance of the coenzyme Q system in yeasts and yeast-like fungi*. In: The Expanding Realm of Yeast-Like Fungi [Hrsg.: DE HOOG, G.S., M.T. SMITH & A.C.M. WEIJMAN], S. 299-308, Amsterdam.
- YAMADA, Y. & H. KAWASAKI (1989) The molecular phylogeny of the Q8-equipped basidiomycetous yeast genera *Mrakia* Yamada et Komogata and *Cystofilobasidium* Oberwinkler et Bandoni based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal ribonucleic acids. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **35**: 173-183.
- YAMADA, Y., H. KAWASAKI, T. NAKASE & I. BANNO (1989a) The phylogenetic relationship of the conidium-forming anamorphic yeast genera *Sterigmatomyces*, *Kurztnanomyces*, *Tsuchiyaea*, and *Fellomyces* and the teleomorphic yeast genus *Sterigmatosporidium* on the basis of the partial sequences of 18S and 26S ribosomal ribonucleic acid. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 2993-3001.
- YAMADA, Y., Y. NAKAGAWA & I. BANNO (1989b) The phylogenetic relationship of the Q9-equipped species of the heterobasidiomycetous yeast genera *Rhodospiridium* and *Leucosporidium* based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal nucleic acids: a proposal of a new genus *Kondoa*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **35**: 377-385.
- YAMADA, Y., T. NAGAHAMA, H. KAWASAKI & I. BANNO (1990) The phylogenetic relationship of the genera *Phaffia* Miller, *Yoneyama* et Soneda and *Cryptococcus* Kützing emend. Phaff et Spencer (Cryptococcaceae) based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal ribonucleic acids. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **36**: 403-414.
- YAMADA, Y., K. MAEDA, T. NAGAHAMA & I. BANNO (1991) The phylogenetic relationships of the Q9-equipped genus *Schwanniomyces* Klockner (Saccharomycetaceae) based on the partial sequences of 18S-ribosomal and 26S-ribosomal RNAs. Significance of the coenzyme Q-system in the classification of yeasts and yeast-like organisms. Part 43. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **37**: 523-528.
- YAMADA, Y. & Y. NAKAGAWA (1992) The phylogenetic relationships of some heterobasidiomycetous yeast species based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **38**: 559-565.
- YAMADA, Y., J.-I. YANO, M. MATSUDA & K. MIKATA (1994) The phylogeny of anamorphic yeast species classified in the genus *Candida* Berkout based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs. *Bull. Fac. Agric. Shizuoka Univ.* **44**: 21-28.
- YAMADA, Y., T. SUZUKI, M. MATSUDA & K. MIKATA (1995) The phylogenetic relationships of the Q9-equipped, hat-shaped ascospore-forming species of the genus *Yamadazyma* Billon-Grand (Saccharomycetaceae) based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**: 445-450.
- YANG, Z. & B. RANNALA (1997) Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov Chain Monte Carlo method. *Mol. Biol. Evol.* **14**: 717-724.
- YAO, Y.-J., D.N. PEGLER & M.W. CHASE (1999) Application of ITS (nrDNA) sequences in the phylogenetic study of *Tyromyces* s.l. *Mycol. Res.* **103**: 219-229.

- ZAMBINO, P.J. & L.J. SZABO (1993) Phylogenetic relationships of selected cereal and grass rusts based on rDNA sequence analysis. *Mycologia* **85**: 401-414.
- ZHANG, W., J.F. WENDEL & L.G. CLARK (1997) Bomboozled again! Inadvertent isolation of fungal rDNA sequences from bamboos (Poaceae: Bambusoideae). *Mol. Phylogenet. Evol.* **8**: 205-217.
- ZUCKERKANDL, E. & L. PAULING (1965) Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theor. Biol.* **8**: 357-366.

## 7.2 Zitierte Internet-Seiten

Die in dieser Arbeit aufgeführten Internet-Seiten in der Reihenfolge ihrer Nennung:

THE INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX - AUTHOR QUERY  
'[http://www.ipni.org/ipni/query\\_author.html](http://www.ipni.org/ipni/query_author.html)'

CLASSIFICATION FROM THE 9<sup>TH</sup> EDITION OF THE DICTIONARY OF FUNGI  
'<http://194.131.255.3/cabipages/Names/fundic.asp>'

DATABASE OF FUNGAL NAMES: INDEXFUNGORUM, FUNINDEX  
'<http://194.131.255.3/cabipages/Names/Names.asp>'

THE INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX QUERY  
'[http://www.ipni.org/ipni/query\\_ipni.html](http://www.ipni.org/ipni/query_ipni.html)'

CONSERVED PRIMER SEQUENCES FOR PCR AMPLIFICATION AND SEQUENCING FROM NUCLEAR RIBOSOMAL RNA  
'<http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>'

COMPARATIVE RNA WEB SITE  
'<http://www.rna.icmb.utexas.edu>'

RIBOSOMAL DATABASE PROJECT II  
'<http://rdp.cme.msu.edu/html>'

THE rRNA WWW SERVER  
'<http://rrna.uia.ac.be>'

CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES (CBS)  
'<http://www.cbs.knaw.nl>'

INSTITUTE FOR FERMENTATION OSAKA (IFO)  
'[http://www.ifo.or.jp/index\\_e.html](http://www.ifo.or.jp/index_e.html)'

16S-LIKE/18S EUKARYOTIC RNA SEQUENCING PRIMERS  
'<http://www.mbl.edu/labs/Sogin/Pages/primers.html>'

GENBANK  
'<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>'

EMBL  
'<http://www.ebi.ac.uk>'

INTERNATIONAL CODE OF BOTANICAL NOMENCLATURE (ST. LOUIS CODE)  
'<http://www.bgbm.fu-berlin.de/iapt/nomenclature/code/SaintLouis/0000St.Luistitle.htm>'



# Anhang



# Anhang I

## rRNA/rDNA-Sequenzen von *Saccharomyces cerevisiae*

Datenbankeinträge aus GENBANK bzw. EMBL (online unter 'http://www.ncbi.nlm.nih.gov' und 'http://www.ebi.ac.uk', BENSON *et al.* 2002, STOESSER *et al.* 2002) von *Saccharomyces cerevisiae* werden als Referenzsequenzen für Positionsangaben der rRNA- bzw. rDNA-Sequenzen in dieser Arbeit verwendet: Accessionnummer J01353 (RUBTSOV *et al.* 1980) für die 18S rRNA, K01048 (RUBIN 1973) für die 5.8S rRNA, J01355 (GEORGIEV *et al.* 1981) für die 26S rRNA. In dem 26S rRNA-Datenbankeintrag sind die nicht-kodierenden Bereiche durch *Kursiv*-Druck abgesetzt und die erste und letzte Base der 26S rRNA durch **Fett**-Druck hervorgehoben.

### 18S rDNA

```
ID   SCRGEA      standard; DNA; FUN; 1798 BP.
AC   J01353; M27607;
SV   J01353.1
DT   10-JUL-1990 (Rel. 24, Created)
DT   04-MAR-2000 (Rel. 63, Last updated, Version 6)
DE   Yeast (S.cerevisiae) 18S ribosomal RNA gene.
KW   18S ribosomal RNA; ribosomal RNA.
OS   Saccharomyces cerevisiae
OC   Eukaryota; Fungi; Ascomycota; Saccharomycotina; Saccharomycetes;
OC   Saccharomycetales; Saccharomycetaceae; Saccharomyces.
RN   [1]
RP   1-1798
RX   MEDLINE; 87031580.
RA   Mankin A.S., Skryabin K.G., Rubtsov P.M.;
RT   "Identification of ten additional nucleotides in the primary
RT   structure of
RT   yeast 18S rRNA";
RL   Gene 44(1):143-145(1986).
RN   [2]
RP   1-1798
RX   MEDLINE; 95076707.
RA   James S.A., Collins M.D., Roberts I.N.;
RT   "Genetic interrelationship among species of the genus
RT   Zygosaccharomyces as
RT   revealed by small-subunit rRNA gene sequences";
RL   Yeast 10(7):871-881(1994).
RN   [3]
RP   1-1798
RX   MEDLINE; 81124299.
RA   Rubtsov P.M., Musakhanov M.M., Zakharyev V.M., Krayev A.S., Skryabin
RA   K.G.,
RA   Bayev A.A.;
RT   "The structure of the yeast ribosomal RNA genes. I. The complete
RT   nucleotide
RT   sequence of the 18S ribosomal RNA gene from Saccharomyces
RT   cerevisiae";
RL   Nucleic Acids Res. 8(23):5779-5794(1980).
CC   [2] revises [1].
FH   Key      Location/Qualifiers
FT   source      1..1798
FT              /db_xref="taxon:4932"
FT              /organism="Saccharomyces cerevisiae"
FT   rRNA      1..1798
FT              /note="18S ribosomal RNA"
```

SQ Sequence 1798 BP; 480 A; 348 C; 459 G; 511 T; 0 other;

```
tatctggttg atcctgccag tagtcatatg cttgtctcaa agattaagcc atgcatgtct 60
aagtataagc aatttataca gtgaaactgc gaatggctca ttaaatacagt tatcgtttat 120
ttgatagttc ctttactaca tggataaacc gtggtaattc tagagctaata acatgcttaa 180
aatctcgacc ctttgaaga gatgtattta ttagataaaa aatcaatgctc ttcggactct 240
ttgatgattc ataataactt ttcgaatcgc atggccttgt gctggcgatg gttcattcaa 300
atctctgccc tatcaacttt cgatggtagg atagtggcct accatggttt caacgggtaa 360
cggggaataa gggttcgatt ccggagaggg agcctgagaa acggctacca catccaagga 420
aggcagcagg cgcgcaaatt acccaatcct aattcagggg ggtagtgaca ataaataacg 480
atacagggcc cttcgggtc ttgtaattgg aatgagtaca atgtaaatac cttaacgagg 540
aacaattgga gggcaagtct ggtgccagca gccgcggtaa tccagctcc aatagcgtat 600
attaaagtgg ttgcagttaa aaagctcgtg gttgaaacttt gggcccgggt ggccgggtccg 660
atctctctgt gtactggatt tccaacgggg cctttccttc tggctaacct tgagtccttg 720
tggctcttgg cgaaccagga cttttacttt gaaaaaatta gagtgttcaa agcaggcgta 780
ttgctcgaat atattagcat ggaataatag aataggacgt ttggttctat tttgttggtt 840
tctaggacca tcgtaatgat taatagggac ggtcgggggc atcggatttc aattgtcgag 900
gtgaaattct tggatttatt gaagactaac tactgcgaaa gcatttgcca aggacgtttt 960
cattaatcaa gaacgaaagt taggggatcg aagatgatct ggtaccgtcg tagtcttaac 1020
cataaactat gccgactaga tcgggtggtg tttttttaat gaccactcg gtaccttacg 1080
agaaatcaaa gtctttgggt tctgggggga gtatggtcgc aaggctgaaa cttaaaggaa 1140
ttgacggaag ggcaccacta ggagtggagc ctgctggctaa tttgactcaa cacggggaaa 1200
ctcaccaggt ccagacacaa taaggattga cagattgaga gctctttctt gattttgtgg 1260
gtgggtggtg atggccgttt ctcagttggt ggagtgattt gtctgcttaa ttgcgataac 1320
gaacgagacc ttaacctact aaatagtggt gctagcattt gctggttatc cacttcttag 1380
agggactatc ggtttcaagc cgatggaagt ttgaggcaat aacaggctctg tgatgccctt 1440
agaacgttct gggccgcacg cgcgctacac tgacggagcc agcagagtcta accttggccg 1500
agaggtcttg gtaatcttgt gaaactccgt cgtgctgggg atagagcatt gtaattattg 1560
ctcttcaacg aggaattcct agtaagcgca agtcatcagc ttgcgttgat tacgtccctg 1620
ccctttgtac acaccgcccg tcgctagtac cgattgaatg gcttagtgag gcctcaggat 1680
ctgcttagag aagggggcaa ctccatctca gagcgggaaa tttggacaaa cttggctcatt 1740
tagaggaact aaaagtcgta acaaggtttc cgtaggtgaa cctgcggaag gatcatta 1798//
```

## 5.8S rDNA

```
ID SCB standard; RNA; FUN; 158 BP.
AC K01048;
SV K01048.1
DT 13-JUN-1985 (Rel. 06, Created)
DT 04-MAR-2000 (Rel. 63, Last updated, Version 2)
DE Yeast (S.cerevisiae) 5.8S ribosomal RNA.
KW 5.8S ribosomal RNA; ribosomal RNA.
OS Saccharomyces cerevisiae
OC Eukaryota; Fungi; Ascomycota; Saccharomycotina; Saccharomycetes;
OC Saccharomycetales; Saccharomycetaceae; Saccharomyces.
RN [1]
RP 1-158
RX MEDLINE; 73187374.
RA Rubin G.M.;
RT "The nucleotide sequence of Saccharomyces cerevisiae 5.8 S ribosomal
RT ribonucleic acid";
RL J. Biol. Chem. 248:3860-3875(1973).
CC Feature table cross reference is made to Erdmann et al. 'Collection
CC of published 5S and 5.8S ribosomal RNA sequences' in Nucleic Acids
CC Res. 11, r105-r133 (1983).
FH Key Location/Qualifiers
FT source 1..158
FT /db_xref="taxon:4932"
FT /organism="Saccharomyces cerevisiae"
FT rRNA 1..158
FT /note="5.8S rRNA (NAR: 98)"
SQ Sequence 158 BP; 41 A; 36 C; 37 G; 44 T; 0 other;
```

aaactttcaa caacggatct cttggttctc gcatcgatga agaacgcagc gaaatgcat 60  
 acgtaatgtg aattgcagaa ttccgtgaat catcgaatct ttgaacgcac attgcgcccc 120  
 ttggtattcc agggggcatg cctgtttgag cgtcattt 158//

## 26S rDNA

ID SCRGIH5 standard; DNA; FUN; 3911 BP.  
 AC J01355;  
 SV J01355.1  
 DT 02-JUL-1986 (Rel. 09, Created)  
 DT 04-MAR-2000 (Rel. 63, Last updated, Version 12)  
 DE *S.cerevisiae* 25S rRNA gene and flanks.  
 KW 25S ribosomal RNA; ribosome inactivating protein.  
 OS *Saccharomyces cerevisiae*  
 OC Eukaryota; Fungi; Ascomycota; Saccharomycotina; Saccharomycetes;  
 OC Saccharomycetales; Saccharomycetaceae; Saccharomyces.  
 RN [1]  
 RP 1-243, 3364-3911  
 RX MEDLINE; 81198935.  
 RA Bayev A., Georgiev O.I., Hadjiolov A.A., Nikolaev N., Skryabin K.G.,  
 RA Zakharyev V.M.;  
 RT "The structure of the yeast ribosomal RNA genes. 3. Precise mapping  
 of the  
 RT 18 S and 25 S rRNA genes and structure of the adjacent regions";  
 RL Nucleic Acids Res. 9(4):789-799(1981).  
 RN [2]  
 RP 114-3505  
 RX MEDLINE; 82150279.  
 RA Georgiev O.I., Nikolaev N., Hadjiolov A.A., Skryabin K.G., Zakharyev  
 V.M.,  
 RA Bayev A.A.;  
 RT "The structure of the yeast ribosomal RNA genes. 4. Complete  
 sequence of  
 RT the 25 S rRNA gene from *Saccharomyces cerevisiae*";  
 RL Nucleic Acids Res. 9(24):6953-6958(1981).  
 RN [3]  
 RP 1-3911  
 RX MEDLINE; 83135781.  
 RA Swanson M.E., Holland M.J.;  
 RT "RNA polymerase I-dependent selective transcription of yeast  
 ribosomal DNA.  
 RT Identification of a new cellular ribosomal RNA precursor";  
 RL J. Biol. Chem. 258(5):3242-3250(1983).  
 FH Key Location/Qualifiers  
 FH  
 FT source 1..3911  
 FT /db\_xref="taxon:4932"  
 FT /organism="Saccharomyces cerevisiae"  
 FT /clone="clone pylra3"  
 FT rRNA **114..3505**  
 FT /note="**25s rrna**"  
 FT old\_sequence 3448  
 FT /citation=[1]  
 SQ Sequence 3911 BP; 1044 A; 734 C; 1077 G; 1056 T; 0 other;

aattccgtga tgggccttta ggttttacca actgcggtca atcttttttt atactgagcg 60  
 tattggaacg ttatcgataa gaagagagcg tctaggcgaa caatgttctt aaagtttgac **114**120  
 ctcaaatacag gtaggagtac ccgctgaact taagcatatc aataagcggg ggaaaagaaa 180  
 ccaaccggat tgccttagta acggcgagtg aagcggcaaa agctcaaatt tgaaatctgg 240  
 taccttcggt gcccgagtgt taatttgagg agggcaactt tggggccggt ccttgtctat 300  
 gttccttgga acaggacgtc atagagggtg agcatcccgt gtggcgagga gtgctgttct 360  
 ttgtaaagtgt ccttcgaaga gtcgagttgt ttgggaatgc agctctaagt gggtggtaaa 420  
 ttccatctaa agctaaatat tggcgagaga ccgatagcga acaagtacag tgatggaaag 480

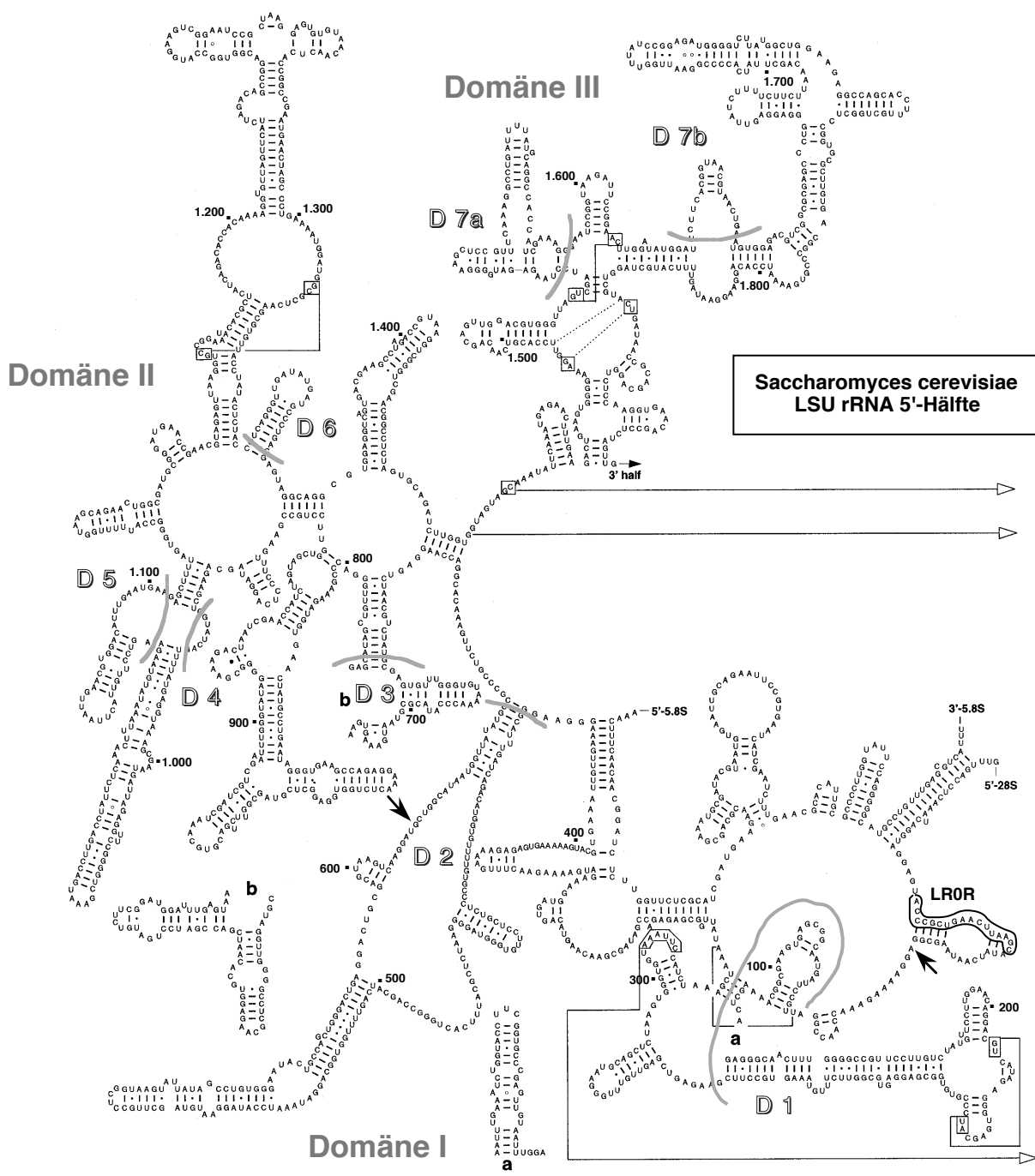
atgaaaagaa	ctttgaaaag	agagtgaaaa	agtacgtgaa	attgttgaaa	gggaagggca	540
tttgatcaga	catggtgttt	tgtgccctct	gctccttgtg	ggtaggggaa	tctcgcattt	600
cactgggccca	gcatcagttt	tggtggcagg	ataaatccat	aggaatgtag	cttgcctcgg	660
taagtattat	agcctgtggg	aatactgccca	gctgggactg	aggactgcga	cgtaagtcaa	720
ggatgctggc	ataatggtta	tatgccgccc	gtcttgaaac	acggaccaag	gagtctaacg	780
tctatgcgag	tgtttgggtg	taaaacccat	acgcgtaatg	aaagtgaacg	taggttgggg	840
cctcgcaaga	ggtgcacaat	cgaccgatcc	tgatgtcttc	ggatggattt	gagtaagagc	900
atagctgttg	ggacccgaaa	gatggtgaac	tatgcctgaa	taggggtgaag	ccagaggaaa	960
ctctggtgga	ggctcgtagc	ggttctgacg	tgcaaatcga	tcgtcgaatt	tgggtatagg	1020
ggcgaaagac	taatcgaacc	atctagtagc	tggttcctgc	cgaagtttcc	ctcaggatag	1080
cagaagctcg	tatcagtttt	atgaggtaaa	gogaatgatt	agaggttccg	gggtcgaaat	1140
gaccttgacc	tattctcaaa	ctttaaatat	gtaagaagtc	cttgttactt	aattgaacgt	1200
ggacatttga	atgaagagct	tttagtgggc	catttttggg	aagcagaact	ggcgatgcgg	1260
gatgaaccga	acgtagagtt	aaggtgccgg	aatacacgct	catcagacac	cacaaaaggt	1320
gtagttcat	ctagacagcc	ggacggtggc	catggaagtc	ggaatccgct	aaggagtgtg	1380
taacaactca	cgggccgaat	gaactagccc	tgaaaatgga	tggcgctcaa	gcgtgttacc	1440
tatactctac	cgtcagggtt	gatatgatgc	cctgacgagt	aggcaggcgt	ggaggtcagt	1500
gacgaagcct	agaccgtaag	gtcgggtcga	acggcctcta	gtcagatct	tgtgggtagt	1560
agcaaatatt	caaatgagaa	ctttgaagac	tgaagtgggg	aaaggttcca	cgtcaacagc	1620
agttggacgt	gggttagtgc	atcctaagag	atggggaagc	tccgtttcaa	aggcctgatt	1680
ttatgcaggc	caccatcgaa	agggaatccg	gtaagattcc	ggaacttggg	tatggattct	1740
tcacggtaac	gtaactgaat	gtggagacgt	cggcgcgagc	cctgggagga	gttatctttt	1800
cttcttaaca	gcttatcacc	ccggaattgg	tttatccgga	gatggggtct	tatggctgga	1860
agaggccagc	acctttgctg	gctccggtgc	gcttgtgacg	gcccgtaaaa	atccacagga	1920
aggaatagtt	ttcatgctag	gtcgtactga	taaccgcagc	aggtctccaa	ggtgaacagc	1980
ctctagttga	tagaataatg	tagataaggg	aagtcggcaa	aatagatccg	taacttcggg	2040
ataaggattg	gctctaaggg	tcgggtagtg	agggccttgg	tcagacgcag	cgggcgtgct	2100
tgtggactgc	ttggtggggc	ttgctctgct	agggcgacta	cttgcgtgcc	ttgtttaga	2160
cggccttggg	aggtctcttg	tagaccgtcg	cttgtacaaa	ttaacagatc	aacttagaac	2220
tggtacggac	aaggggaatc	tgactgtcta	attaaaacat	agcatgcga	tggtcagaaa	2280
gtgatgttga	cgcaatgtga	tttctgccc	gtgctctgaa	tgtcaaagtg	aagaaattca	2340
accaagcgcg	agtaaacggc	gggagtaact	atgactctct	taaggtagcc	aaatgcctcg	2400
tcacttaatt	agtgacgcgc	atgaatggat	taacgagatt	cccactgtcc	ctatctacta	2460
tctagcgaaa	ccacagccaa	gggaacgggc	ttggcagaat	cagcggggaa	agaagaccct	2520
gttgagcttg	actctagttt	gacattgtga	agagacatag	aggggttaga	ataagtggga	2580
gcttcggcgc	cagtgaataa	ccactacctt	tatagtttct	ttacttattc	aatgaagcgg	2640
agctggaatt	cattttccac	gttctagcat	tcaaggtccc	attcggggct	gatccggggt	2700
gaagacattg	tcaggtgggg	agtttggctg	gggcggcaca	tctgttaaac	gataacgcag	2760
atgtcctaag	gggggctcat	ggagaacaga	aatctccagt	agaacaaaag	ggtaaagccc	2820
cttagtttga	tttcagtgtg	aatacaaac	attgaaagtg	tggcctatcg	atcctttagt	2880
ccctcggaat	ttgaggctag	aggtgccaga	aaagttacca	cagggataac	tggcttgtgg	2940
cagtcaagcg	ttcatagcga	cattgctttt	tgattcttcg	atgtcggctc	ttcctatcat	3000
accgaagcag	aattcggtaa	gcgttggatt	gttcaccac	taatagggaa	catgagctgg	3060
gtttagaccg	tcgtgagaca	ggttagtttt	accctactga	tgaatgttac	cagcaatagt	3120
aattgaactt	agtacgagag	gaacagttca	ttcggataat	tggtttttgc	ggctgtctga	3180
tcaggcattg	ccgcgaagca	ccatccgctg	gattatggct	gaacgcctct	aagtcagaat	3240
ccatgctaga	acgcggtgat	ttctttgctc	cacacaatat	agatggatac	gaataaggcg	3300
tccttgtggc	gtcgtgaac	catagcaggc	tagcaacggg	gcacttggcg	gaaaggcctt	3360
gggtgcttgc	tggcgaattg	caatgtcatt	ttgcgtgggg	ataaatcatt	tgtatacgac	3420
ttagatgtac	aacggggtat	tgtaagcggg	agagtagcct	tgttgttacg	atctgctgag	3480
attaagcctt	tgttgtctga	tttg <del>t</del> ttttt	at <del>t</del> ttctttct	aagtgggtac	tggcaggagc	3505
cggggcctag	tttagagaga	agtagactca	acaagtctct	ataaatttta	tttgtcttaa	3540
gaattctatg	atccgggtaa	aaacatgtat	tgtatataatc	tattataata	tacgatgagg	3600
atgatagtgt	gtaagagtgt	accatttact	aatgtatgta	agttactatt	tactatttgg	3720
tctttttatt	ttttattttt	tttttttttt	tcgltgcaaaa	gatgggttga	aagagaaggg	3780
ctttcacaaa	gcttcccagag	cgtgaaagga	tttgcccggg	cagtttgcct	catggagcag	3840
ttttttccgc	accatcagag	cggcaaacat	gagtgcttgt	ataagtttag	agaattgaga	3900
aaagctcatt	t					3911//

## Anhang II

### Sekundärstrukturmodell der 26S rRNA von *Saccharomyces cerevisiae*

Das in zwei Teile, den 5'-Bereich und den 3'-Bereich, untergliederte Sekundärstrukturmodell der 26S rRNA stammt aus der Datenbank des RDP, Release 2.1, Dezember 1994 (GUTELL *et al.* 1993, MAIDAK *et al.* 1994).

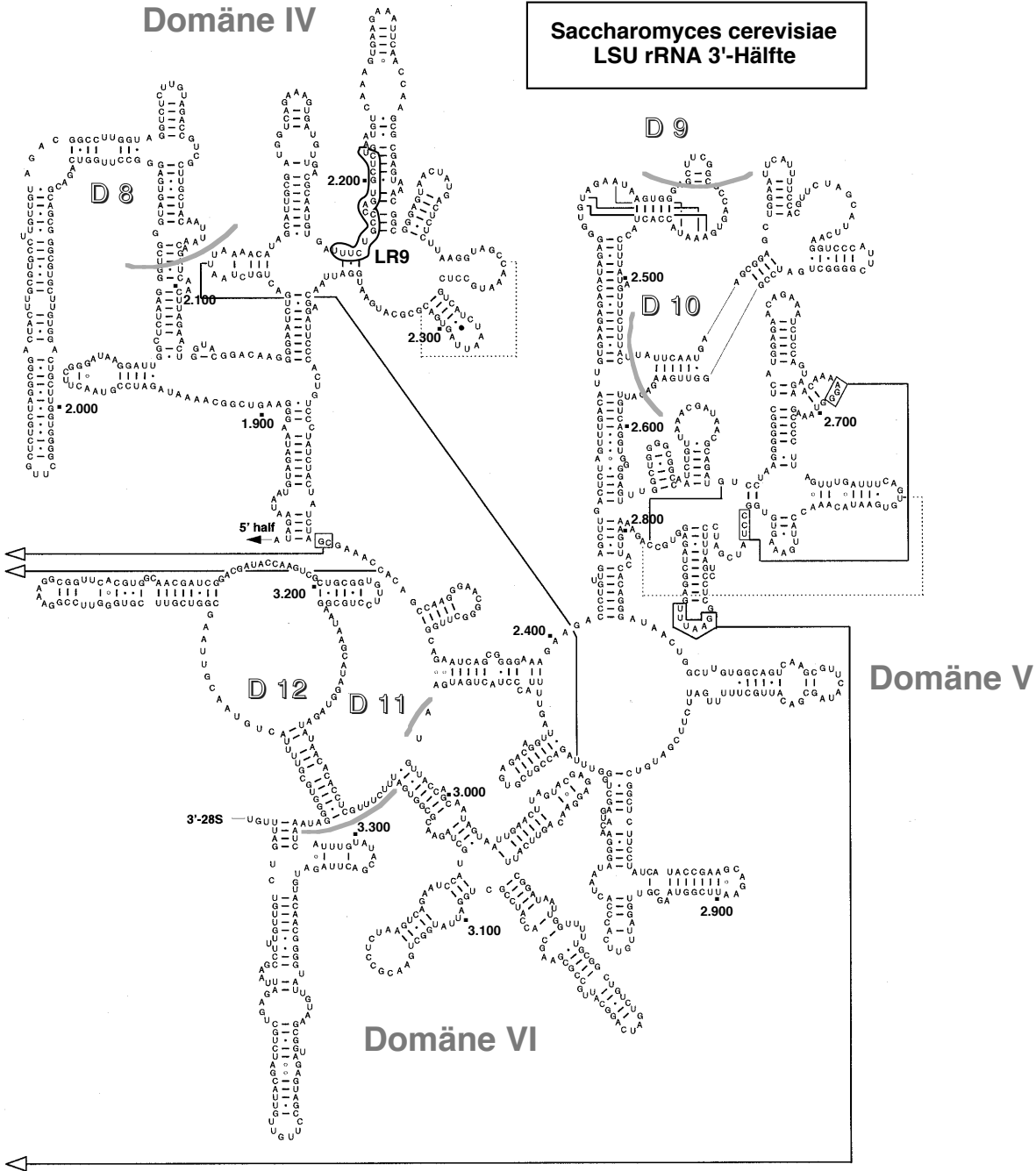
In diesen Modellen wurden zusätzliche Informationen eingetragen: Die Numerierung der Basenpositionen aufgrund des EMBL-Eintrages J01355 ist angegeben, und die sechs strukturellen Domänen I bis VI nach NOLLER *et al.* (1981) sowie die 13 bei MICHOT *et al.* (1984) und HASSOUNA *et al.* (1984) beschriebenen divergierenden Regionen D1 bis D12 sind gekennzeichnet. Auch die Lage der in dieser Arbeit verwendeten PCR-Primer LR0R und LR9 ist eingetragen. Beginn und Ende des Alignments der Domäne I (siehe Anhang XIII) sind mit Pfeilen gekennzeichnet.





# Domäne IV

## Saccharomyces cerevisiae LSU rRNA 3'-Hälfte



## Anhang III

### GC-Werte von *Exobasidium*-Stämmen nach BLANZ & OBERWINKLER (1983)

Zusammenstellung der Daten aus den Tabellen des Artikels. Die dort vorgenommene Gruppierungen richteten sich nach GC-Werten und Wirtsarten, sowie Befallsbild. Hier folgt die Auflistung der zehn in dem Artikel gefundenen Gruppen nur abnehmenden GC-Werten.

Gruppe	Stamm	GC-Wert	Wirt
1	PB 3276	68,1%	<i>V. oxycoccos</i> L.
	PB 383	68,1%	<i>V. uliginosum</i> L.
	PB 393	67,1%	<i>V. vitis-idaea</i> L.
	PB 3278	65,8%	<i>V. uliginosum</i> L.
5	PB 4898 <sup>1)</sup>	55,9%	<i>Rh. spec.</i>
	PB 2857e	55,5%	<i>Rh. x intermedium</i> Tausch
10	CBS 247.52	53,2%	<i>Camellia spec.</i>
8	PB 4350	52,8%	<i>And. polifolia</i> L.
2	PB 3277	51,7%	<i>V. macrocarpum</i> Aiton
	FO 31777	51,4%	<i>V. oxycoccos</i> L.
	PB 3275	50,5%	<i>V. oxycoccos</i> L.
	FO 24018	50,4%	<i>Arctostaphylos uva-ursi</i> (L.) Spreng.
	PB 1828	48,6%	<i>V. myrtillus</i> L.
	PB 4162	48,0%	<i>V. vitis-idaea</i> L.
6	PB 5634	47,7%	<i>Rh. x intermedium</i> Tausch
	PB 4380	47,1%	<i>Rh. ferrugineum</i> L.
3	PB 4153	44,7%	<i>V. uliginosum</i> L.
	FO 31778	44,4%	<i>V. uliginosum</i> L.
	FO 31678	43,7%	<i>V. uliginosum</i> L.
9	PB 5635	43,7%	<i>And. polifolia</i> L.
7	PB 3684	40,3%	<i>Rh. indicum</i> (L.) Sweet (= <i>Azalea indica</i> L.)
4	FO 31761	39,9%	<i>V. vitis-idaea</i> L.
	PB 4143 <sup>2)</sup>	39,4%	<i>V. vitis-idaea</i> L.
	PB 394	39,2%	<i>V. vitis-idaea</i> L.
	PB 1834	39,1%	<i>V. vitis-idaea</i> L.

<sup>1)</sup> Bei der GC-Wertbestimmung wurden keine Strichnummern publiziert. Es handelt sich wie bei den DNA-DNA-Hybridisierungen um PB 4898-1, P. BLANZ pers.Mitt.

<sup>2)</sup> Der Wirt von Stamm PB 4143 ist *V. vitis-idaea* und nicht wie im Artikel angegeben *V. myrtillus* (siehe dazu auch Kapitel 2.1).

## Anhang IV

### DNA-DNA-Homologien von *Exobasidium*-Stämmen nach BLANZ (1986) und BLANZ & DÖRING (1995)

Ausschnitt aus Tab.1 des Artikels von BLANZ & DÖRING (1995), ergänzt um Angaben nach BLANZ (1986). In dem Artikel von 1995 beruhte die Aufteilung in insgesamt 14 Gruppen auf einer Kombination aus RFLP-Mustern, DNA-DNA-Hybridisierungssignalen und GC-Werten sowie Wirtsarten. Allerdings sind nur für Vertreter aus acht dieser Gruppen DNA-DNA-Homologie-Daten („A“ bis „H“) beschrieben. Für einige zusätzliche Stämme liegen Hybridisierungsdaten von 1986, welche ebenfalls diesen acht DNA-DNA-Homologie-Gruppen zugeordnet werden können. In der nachfolgenden Tabelle sind alle *Exobasidium*-Stämme aufgelistet, für die DNA-DNA-Homologie-Daten vorliegen. Die als Sonden eingesetzten Stämme sind dabei durch **Fettdruck** hervorgehoben.

Die Trennung der Gruppen G und H in den zitierten Arbeiten erfolgte nur aufgrund der Wirte (*Rhododendron* spp. bzw. Azalee). Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit werden die fünf betroffenen Stämme für die DNA-DNA-Homologien durch eine gemeinsame Buchstabenkennung „x“ gekennzeichnet. Diese Gruppe x ist nur dadurch charakterisiert, daß die ihr zugeordneten Stämme mit keiner der beiden getesteten von *Rhododendron*-Parasiten stammenden Sonden (PB 2857e, PB 5634), welche die Gruppen E und F charakterisieren, Hybridisierungssignale ergaben. Es ist für diese Stämme keine Konspezifität durch positive Hybridisierungssignale nachgewiesen, und es sind daher auch keinerlei Aussagen über eine eventuelle Konspezifität möglich. Die Auftrennung ausschließlich aufgrund der DNA-DNA-Homologie ist in der nachfolgenden Tabelle damit in sieben Gruppen wiedergegeben, von denen die letzte nur durch fehlende Hybridisierungssignale von den übrigen unterschieden, aber nicht in sich als einheitlich nachgewiesen ist.

In den zitierten Arbeiten sind zusätzlich noch die Stärken der einzelnen Hybridisierungssignale wiedergegeben. Darauf wurde in dieser Zusammenfassung verzichtet. Allerdings ist zu Sonde PB 1828, welche die Gruppe B charakterisiert, anzumerken, daß die Stämme PB 3275 und FO 31777 mit ihr nur schwache Signale ergaben. Allerdings zeigten diese zwei Stämme auch mit keiner der anderen Sonden irgendwelche Signale. Außerdem ergab die Sonde PB 1828 auch mit Stamm FO 31778 aus Gruppe C, der ein eindeutiges Signal mit Sonde PB 4153 zeigte, ein zusätzliches schwaches Signal.

Gruppe	Stamm	Wirt
<b>A</b>	PB 3276	<i>V. oxycoccos</i>
	PB 383	<i>V. uliginosum</i>
	<b>PB 393</b>	<i>V. vitis-idaea</i>
<b>B</b>	PB 3277	<i>V. macrocarpum</i>
	<b>PB 1828</b>	<i>V. myrtillus</i>
	FO 31777	<i>V. oxycoccos</i>
	PB 3275	<i>V. oxycoccos</i>
	FO 23898	<i>V. vitis-idaea</i>
<b>C</b>	FO 31778	<i>V. uliginosum</i>
	<b>PB 4153</b> <sup>1)</sup>	<i>V. uliginosum</i>
<b>D</b>	FO 31761	<i>V. vitis-idaea</i>
	<b>PB 1834</b>	<i>V. vitis-idaea</i>
	<b>PB 3385</b>	<i>V. vitis-idaea</i>
	PB 4143	<i>V. vitis-idaea</i>
<b>E</b>	<b>PB 2857e</b>	<i>Rh. x intermedium</i>
	PB 4898-1	<i>Rh. spec.</i>
<b>F</b>	FO 24040-1	<i>Rh. ferrugineum</i>
	PB 4163	<i>Rh. ferrugineum</i>
	PB 4380	<i>Rh. ferrugineum</i>
	<b>PB 5634</b>	<i>Rh. x intermedium</i>
<b>x</b>	PB 3684	<i>Rh. indicum</i> (= <i>Azalea indica</i> )
	PB 4864-1	<i>Menz. ferruginea</i>
	FO 24040-3	<i>Rh. ferrugineum</i>
	FO 31767	<i>Rh. ferrugineum</i>
	PB 4381	<i>Rh. hirsutum</i>

<sup>1)</sup> PB 4153 wurde in dem Artikel in der Tabelle als „PB 415“ abgedruckt.

## Anhang V

### Mit CAM 2.0 bestimmte Größen der 26S rDNA PCR-Produkte (LR0R/LR9)

Die PCR-Produktgrößen (in bp) in 13 ausgewählten Gelen (Agarosekonzentrationen 0,6 - 1,5%) wurden mit CAM 2.0 bestimmt. Die Gelbilder wurden geometrisch korrigiert, z.T. kontrastiert. Die Gele 1 bis 3 waren mit langer Trennstrecke für Größenbestimmungen und direkte Vergleiche angefertigt worden, alle übrigen hatten eine kurze Trennstrecke. Es diente die 1kb DNA-Leiter als Standard. Die Stämme sind nach den manuell bestimmten PCR-Produktgrößenklassen aufgelistet. Sind für einen Stamm bei einem Gel mehrere Werte eingetragen, so sind mehrere PCR-Amplifikate in diesem Gellauf analysiert worden (z.B. von verschiedenen DNA-Verdünnungen). Für jeden Stamm ist der minimale und maximale Wert über alle Gele gesehen **fett** hervorgehoben.  $\Delta$  = Differenz zwischen diesen Minimum- und Maximumwerten (in bp),  $\Delta/\text{Min}$  = Differenz/Minimumwert („prozentualer Unterschied“).

	Stamm	Gel 1 0,8%	Gel 2 0,8%	Gel 3 0,8%	Gel 4 0,6%	Gel 5 0,6%	Gel 6 0,8%	Gel 7 0,8%	Gel 8 1,5%	Gel 9 0,7%	Gel 10 1,0%	Gel 11 0,8%	Gel 12 0,8%	Gel 13 0,8%	Δ (bp)	Δ/Min (%)
2.2 kb	FO 24040-3		2.201					2.219 2.259	2.229	2.167					92	4,3
	FO 31767		2.201				2.167	2.341	2.267	2.194			2.201		174	8
	PB 383		2.274		2.236	2.167					2.380		2.201		213	9,8
	PB 393 = RBF 1008		2.274 2.249	2.195	2.236	2.167							2.248 2.332 2.373 2.201		206	9,5
	PB 2857e		2.225	2.178	2.236								2.332 2.251	2.248	154	7,1
	PB 3276		2.249													
	PB 4381		2.201	2.178	2.207									2.156 2.201	51	2,4
	PB 4898-7										2.223 2.251				28	1,3
	PB 4898-19			2.212					2.219 2.259	2.267					55	2,5
	PB 5634		2.249	2.144		2.139	2.341 2.380		2.267	2.223					241	11,3
	RBF 726		2.299	2.178	2.264									2.288	121	5,6

	Stamm	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Gel 4	Gel 5	Gel 6	Gel 7	Gel 8	Gel 9	Gel 10	Gel 11	Gel 12	Gel 13	Δ	Δ/Min
		0,8%	0,8%	0,8%	0,6%	0,6%	0,8%	0,8%	1,5%	0,7%	1,0%	0,8%	0,8%	0,8%	(bp)	(%)
2.5 kb	CBS 183.56	<b>2.535</b>			2.571							<b>2.685</b>			150	6
	FO 31761					<b>2.477</b>					<b>2.697</b>				220	8,9
	PB 394										2.697					
	PB 1834							<b>2.749</b>	<b>2.640</b>						109	4,1
	PB 3385	2.535		<b>2.512</b>	2.538							<b>2.638</b>	2.548		126	5
	PB 4143					<b>2.511</b>		<b>2.700</b>	2.640						189	7,5
	RBF 727		<b>2.510</b>								<b>2.640</b>				130	5,2
	RBF 763		<b>2.538</b>								<b>2.640</b>				102	4
	RBF 765		<b>2.510</b>	2.532		2.511					<b>2.640</b>		2.548		130	5,2
2.6 kb	CBS 153.85 =		2.595				2.807		2.640							
	RBF 725		<b>2.566</b>				<b>2.855</b>									
	CBS 157.85	<b>2.598</b>						2.749	2.685						289	11,3
	CBS 240.50	<b>2.598</b>						<b>2.799</b>							201	7,7
	FO 24040-2			<b>2.573</b>						<b>2.731</b>					151	5,8
	FO 31778	<b>2.598</b>			2.671								<b>2.811</b>		158	6,1
	PB 1828					<b>2.544</b>				<b>2.624</b>					213	8,2
	PB 3684	2.598	2.595	<b>2.573</b>	<b>2.637</b>										80	3,1
	PB 4153	2.566				<b>2.511</b>							2.601		64	2,5
	PB 4163	2.598	<b>2.595</b>				<b>2.855</b>		2.685				<b>2.656</b>		145	5,8
	PB 4380									2.624					260	10
	PB 4864-3									2.727						
	PB 4864-4									<b>2.727</b>					35	1,3
	PB 4898-17			<b>2.615</b>						<b>2.658</b>					43	1,6
	RBF 724	<b>2.598</b>			2.671		<b>2.807</b>		2.685						209	8
	RBF 737				<b>2.671</b>								<b>2.623</b>		48	1,8

	Stamm	Gel 1 0,8%	Gel 2 0,8%	Gel 3 0,8%	Gel 4 0,6%	Gel 5 0,6%	Gel 6 0,8%	Gel 7 0,8%	Gel 8 1,5%	Gel 9 0,7%	Gel 10 1,0%	Gel 11 0,8%	Gel 12 0,8%	Gel 13 0,8%	Δ (bp)	Δ/Min (%)
2.8 kb	FO 31777	2.798	<b>2.744</b>					<b>2.957</b>	2.921						213	7,8
	PB 3275	2.798	2.775		<b>2.846</b>	<b>2.756</b>							2.828		90	3,3
	PB 3277	<b>2.833</b>				<b>2.756</b>									77	2,8
	RBF 746	2.833	2.775	<b>2.768</b>	2.810								2.882 2.831 <b>2.934</b>		166	6
2.9 kb	CBS 156.85				<b>2.995</b>									<b>3.086</b> 3.014	91	3
	PB 4864-2									3.106						
	PB 5635	<b>2.868</b>					<b>3.161</b>		2.971						293	10,2
	RBF 729	2.940	<b>2.839</b>	2.884	<b>2.995</b>	2.869									156	5,5
	RBF 732	<b>2.904</b>					<b>3.161</b>		2.971						257	8,9
	RBF 733	<b>2.940</b>			<b>2.919</b>										21	0,7

## Anhang VI

### Mit CAM 2.0 nachbestimmte Größen von Fragmenten der DNA-Größenstandards in PCR-Agarosegelen

Mit CAM 2.0 wurden die Fragmente der DNA-Größenstandards in Agarosegelen nachbestimmt. Jeweils eine Markerspür pro Gel wurde als Standard definiert, und die Größen der Banden in weiteren Markerspuren wurden nachbestimmt. Repräsentative Beispiele sind hier aufgelistet, wobei nur die Werte der Fragmente wiedergegeben werden, die im Bereich der 26S rDNA PCR-Produktgrößen liegen. Angegeben sind die mit CAM bestimmten Werte (in bp), die Abweichung zur bekannten Größe der Markerbande ( $\Delta$ , in bp) und die „prozentuale Differenz“ zwischen tatsächlichem und ermitteltem Wert ( $\% = \Delta/\text{Fragmentgröße}$ ).

**Tab.1:** Gele mit langer Trennstrecke und je 3 Markerspuren (1kb DNA-Leiter, Gibco BRL).

1kb-Leiter	Gel I links	$\Delta$	%	Gel I rechts	$\Delta$	%	Gel II links	$\Delta$	%	Gel II rechts	$\Delta$	%
4.072	4.016	- 56	1,38	4.119	+ 47	1,15	4.053	- 19	0,47	4.053	- 19	0,05
3.054	2.972	- 82	2,69	3.006	- 48	1,57	3.058	+ 4	0,13	3.032	- 22	0,72
2.036	2.019	- 17	0,84	2.041	+ 5	0,25	2.046	+ 10	0,49	2.030	- 6	0,29
1.636	1.648	+ 12	0,73	1.665	+ 29	1,77	1.660	+ 24	1,47	1.647	+ 11	0,67
1.018	1.030	+ 12	1,18	1.042	+ 24	2,36	1.026	+ 8	0,79	1.026	+ 8	0,79

**Tab.2:** Gele mit kurzer Trennstrecke und je 2 oder 3 Markerspuren (1kb DNA-Leiter, Gibco BRL). — = Bande konnte nicht nachbestimmt werden.

1kb-Leiter	Gel A links	$\Delta$	%	Gel B links	$\Delta$	%	Gel C links	$\Delta$	%
4.072	4.035	- 37	0,9	4.242	+ 170	4,17	—	—	—
3.054	3.021	- 33	1,08	3.078	+ 24	0,79	3.117	+ 63	2,06
2.036	2.010	- 26	1,28	2.031	- 5	0,25	1.994	- 42	2,06
1.636	1.625	- 11	0,67	1.653	+ 17	1,04	1.623	- 13	0,79
1.018	1.012	- 6	0,59	1.024	+ 6	0,59	1.010	- 8	0,79

Gel D links	$\Delta$	%	Gel E links	$\Delta$	%	Gel E rechts	$\Delta$	%	Gel F links	$\Delta$	%
4.109	+ 37	0,91	4.063	- 9	0,22	4.063	- 9	0,22	4.240	+ 168	4,13
3.102	+ 48	1,57	3.011	- 43	1,4	3.075	+ 21	0,69	3.209	+ 155	5,08
2.022	- 14	0,69	2.024	- 12	0,59	2.024	- 12	0,59	2.098	+ 62	3,05
1.609	- 27	1,65	1.633	- 3	0,18	1.633	- 3	0,18	1.695	+ 59	3,61
1.015	- 3	0,29	1.022	+ 4	0,39	996	- 22	2,16	1.031	+ 13	1,28



**Tab.3:** Gele mit kurzer Trennstrecke und je 2 Markerspuren (Standard Nr. VII, Boehringer).  
In Gel b waren die 1.850 und 1.900 bp-Banden nicht getrennt.

Marker VII	Gel a rechts	$\Delta$	%	Marker VII	Gel b rechts	$\Delta$	%
3.500	3.530	+ 30	0,86	3.500	3.631	+ 131	3,74
2.700	2.691	- 9	0,33	2.700	2.806	+ 106	3,93
1.900	1.887	- 13	0,68	1.875	1.913	+ 38	2,03
1.850	1.807	- 43	2,32				
1.500	1.463	- 37	2,46	1.500	1.489	- 11	0,73
1.400	1.360	- 40	2,86	1.400	1.364	- 36	2,57
1.150	1.142	- 8	0,7	1.150	1.145	- 5	0,43
1.000	979	- 21	2,1	1.000	977	- 23	2,3

## Anhang VII

### Mit CAM 2.0 nachbestimmte Größen von Fragmenten des DNA-Größenstandards in PCR-RFLP-Gelen (VisiGel-Matrix)

Fragmente der 1kb DNA-Leiter wurden mit CAM 2.0 in PCR-RFLP-Gelen (VisiGel-Matrix) nachbestimmt. Bei diesem repräsentativen Beispiel wurde die mittlere von fünf Markerspuren als Standard definiert, die Eichkurve über die Banden von 75 bis 2.036 bp erstellt. Die Größen der Fragmente in den übrigen Markerspuren wurden ermittelt. Angegeben sind die mit CAM ermittelten Werte (in bp), die Abweichung zur bekannten Größe der Bande ( $\Delta$ , in bp) und die „prozentuale Differenz“ zwischen tatsächlichem und ermitteltem Wert ( $\% = \Delta/\text{Fragmentgröße}$ ).

1kb DNA Leiter	Marker links außen	$\Delta$	%	Marker mitte links <sup>1)</sup>	$\Delta$	%	Marker mitte rechts	$\Delta$	%	Marker rechts außen	$\Delta$	%
1.018	1.042	+ 24	2,4	1.070 1.010	+ 52 - 8	5,1 0,79	1.099	+ 81	8	1.042	+ 24	2,4
517	521	+ 4	0,78	516	- 1	1,8	530	+ 13	2,5	521	+ 4	0,78
506	498	- 8	1,6	477	- 29	5,7	486	- 20	4	498	- 8	1,6
396	401	+ 5	1,3	395	- 1	0,25	398	+ 2	0,51	401	+ 5	1,3
344	343	- 1	0,29	340	- 4	1,2	340	- 4	1,2	343	- 1	0,29
298	297	- 1	0,34	297	- 1	0,34	294	- 4	1,3	294	- 4	1,3
220	219	- 1	0,45	219	- 1	0,45	218	- 2	0,91	218	- 2	0,91
201	202	+ 1	0,5	201	0	0	199	- 2	1	199	- 2	1
154	154	0	0	153	- 1	0,65	153	- 1	0,65	153	- 1	0,65
134	136	+ 2	1,5	135	+ 1	0,75	135	+ 1	0,75	135	+ 1	0,75
75	75	0	0	73	- 2	2,7	75	0	0	75	0	0

<sup>1)</sup> In dieser Markerspur wurde das 1.018 bp große Fragment nicht gut getrennt und von CAM wegen des schlechten Laufverhaltens mit zwei Intensitätsmaxima als zwei Banden erkannt.

## Anhang VIII

### Vergleich der mit CAM 2.0 bestimmten Größen der Fragmente zweier interner Standards in PCR-RFLP-Gelen

Mit CAM 2.0 wurden die Größen der Fragmente zweier interner Standards (RBF 729 und PB 1834) bestimmt. Hier sind beispielhaft zwei Gelläufe für alle sechs Restriktionsenzyme aufgelistet. Es wurden nur die Banden in den Vergleich einbezogen, die in beiden Gelen von CAM automatisch erkannt wurden. Über den „Set“-Modus definierte Banden wurden wegen eventueller Ungenauigkeiten der manuellen Festlegung nicht berücksichtigt. Angegeben sind die mit CAM bestimmten Werte (in bp), die Differenz beider Werte ( $\Delta$ , in bp) und  $\Delta/\text{Min}$  = Differenz/Minimumwert („prozentualer Unterschied“).

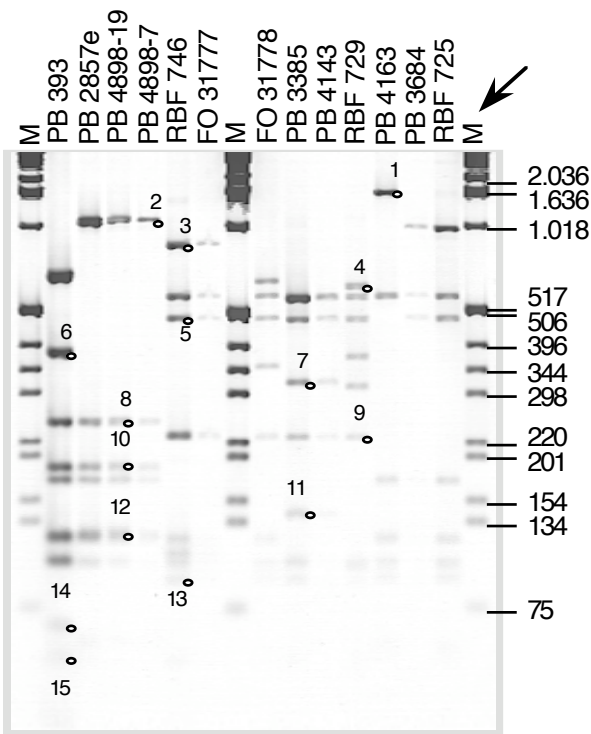
<b>RBF 729</b>	<b>Gel a</b>	<b>Gel b</b>	<b><math>\Delta</math> (bp)</b>	<b><math>\Delta/\text{Min}</math> (%)</b>
<b>Ava II</b>	527	511	16	3,13
<b>Cfo I</b>	884	877	7	0,8
	815	783	32	4,09
	453	434	19	4,38
	320	314	6	1,91
	269	264	5	1,89
	144	146	2	1,39
<b>Hae III</b>	584	595	11	1,88
	551	559	8	1,45
	486	476	10	2,1
	374	368	6	1,63
	306	308	2	0,65
	229	227	2	0,88
	101	100	1	1,0
<b>Hinf I</b>	476	486	10	2,1
	410	418	8	1,95
	322	330	8	2,48
	297	308	11	3,7
	193	192	1	0,52
	128	119	9	7,56
<b>Msp I</b>	1.140	1.068	72	6,74
	940	872	68	7,8
	560	573	13	2,32
	247	241	6	2,49
	163	157	6	3,82
<b>Taq I</b>	791	775	16	2,06
	520	516	4	0,77
	389	391	2	0,51
	200	206	6	3,0
	137	140	3	2,19

<b>PB 1834</b>	<b>Gel a</b>	<b>Gel b</b>	<b><math>\Delta</math> (bp)</b>	<b><math>\Delta/\text{Min}</math> (%)</b>
<b>Ava II</b>	1.471	1.376	95	6,9
	515	516	1	0,19
<b>Cfo I</b>	893	898	5	0,56
	630	646	16	2,54
<b>Hae III</b>	559	549	10	1,82
	315	311	4	1,29
	227	231	4	1,76
<b>Hinf I</b>	921	930	9	0,98
	492	486	6	1,23
	420	424	4	0,95
	308	306	2	0,65
<b>Msp I</b>	1.530	1.668	138	9,02
	573	548	25	4,56
	241	240	1	0,42
	157	163	6	3,82
<b>Taq I</b>	587	596	9	1,53
	508	501	7	1,4
	391	361	30	8,31
	333	306	27	8,82

## Anhang IX

### Mit CAM 2.0 bestimmte Größen ausgewählter Restriktionsfragmente unter unterschiedlichen Eichkurven

Mit CAM 2.0 wurden die Größen von 15 ausgewählten Fragmenten in einem PCR-RFLP-Gel (Restriktionsansatz mit *Hae* III) unter drei unterschiedlichen Eichkurven vergleichend bestimmt. Die Abbildung zeigt die linke Hälfte des geometrisch korrigierten PCR-RFLP-Gelbildes (VisiGel-Matrix) in Inversdarstellung und Kontrast verstärkt - gespeichert in tif-Datei mit nachträglich eingefügten Markierungen der Banden (●). Die mittlere Spur der DNA-Größenstandards (M) = 1kb DNA-Leiter (im Bildausschnitt rechts, mit → gekennzeichnet) wurde als Standard für die Eichkurven definiert. Die Stammnummern sind angegeben.



Drei Eichkurven wurden über unterschiedliche Fragmentbereiche des Standards definiert: Banden von 75 bp bis 2.036 bp, Banden von 134 bp bis 2.036 bp und Banden von 75 bp bis 1.636 bp. Die unter diesen Eichkurven in CAM ermittelten Größen der ausgewählten Fragmente (in bp) sind aufgelistet, die maximale Differenz zwischen diesen Werten ( $\Delta$ , in bp) und  $\Delta/\text{Min} = \text{Differenz}/\text{Minimumwert}$  („prozentualer Unterschied“) sind angegeben.

Bande	Eichkurve 75 - 2.036	Eichkurve 134 - 2.036	Eichkurve 75 - 1.636	$\Delta$ (bp)	$\Delta/\text{Min}$ (%)
1	1.584	1.584	1.668	84	5,3
2	1.143	1.145	1.174	31	2,71
3	857	858	866	9	1,05
4	619	621	619	2	0,32
5	481	482	478	4	0,84
6	385	385	382	3	0,79
7	317	317	314	3	0,96
8	248	248	246	2	0,81
9	227	227	226	1	0,44
10	189	189	189	0	0,0
11	142	141	142	1	0,71
12	124	124	125	1	0,81
13	92	91	94	3	3,3
14	65	64	68	4	6,25
15	47	49	53	6	12,77

## Anhang X

### Mit CAM 2.0 bestimmte Größen aller Fragmente zweier interner Standards

Um die Summen der Größen der Restriktionsfragmente zu errechnen, wurden die Größen aller Fragmente mit CAM 2.0 bestimmt - unabhängig davon ob die Banden im „Search“- oder „Set“-Modus definiert wurden. Für die zwei internen Standards RBF 729 und PB 1834 sind die bestimmten Fragmentgrößen (in bp) hier als Beispiel vergleichend aufgelistet. Mehrfachbanden sind entsprechend gekennzeichnet.

	<b>RBF 729</b>	<b>PB 1834</b>
<i>Ava</i> II	1.964	1.471
	527	515
	195	195
	156	156
	2x 146	2x 149
<i>Cfo</i> I	884	893
	815	630
	453	584
	320	320
	269	100
	100	
<i>Hae</i> III	584	2x 559
	551	476
	486	315
	374	227
	306	138
	229	104
	2x 101	91
	89	44
	44	

	<b>RBF 729</b>	<b>PB 1834</b>
<i>Hinf</i> I	476	921
	3x 410	492
	322	420
	297	308
	193	192
	128	77
	88	51
<i>Msp</i> I	64	
	1.140	1.530
	940	573
	560	241
	247	157
<i>Taq</i> I	163	39
	49	
	791	587
	2x 520	508
	389	391
	200	333
	137	176
125	141	
100	128	
	111	

# Anhang XI

## Distanzmatrix der RFLP-Daten

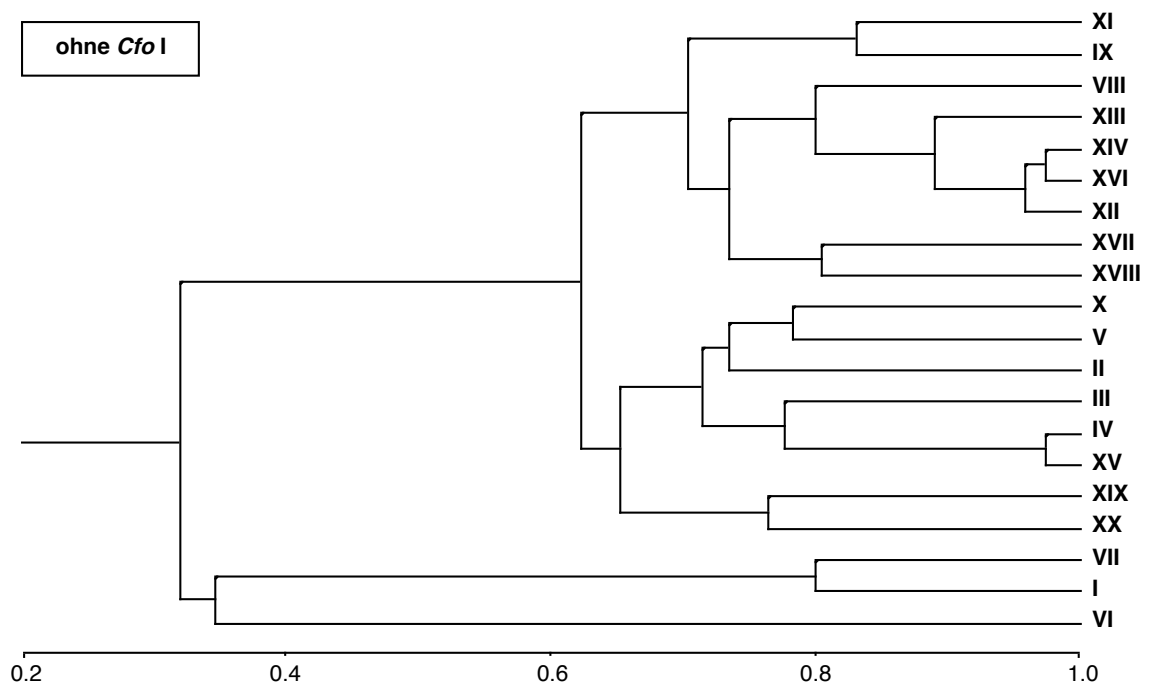
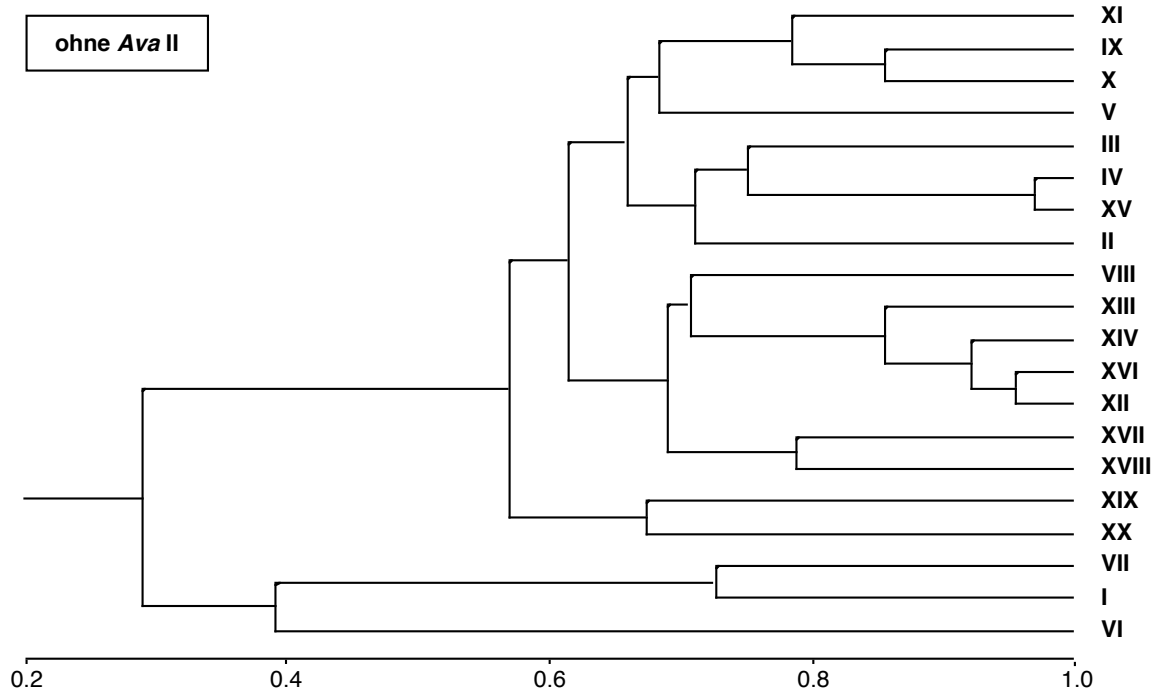
Distanzmatrix aus den RFLP-Daten der 0/1-Matrix (Tab.3.1.3.3-1). Die paarweisen Distanzwerte wurden mit dem DICE-Koeffizienten in NTSYS errechnet.

	<b>XI</b>	<b>IX</b>	<b>X</b>	<b>VII</b>	<b>I</b>	<b>VI</b>
<b>XI</b>	1.0000000					
<b>IX</b>	0.8108108	1.0000000				
<b>X</b>	0.7368421	0.8421053	1.0000000			
<b>VII</b>	0.4691358	0.4444444	0.4337349	1.0000000		
<b>I</b>	0.3809524	0.3809524	0.3488372	0.7472527	1.0000000	
<b>VI</b>	0.2857143	0.2857143	0.2784810	0.3095238	0.3678161	1.0000000
<b>V</b>	0.6493506	0.6233766	0.7341772	0.2857143	0.2758621	0.2500000
<b>III</b>	0.6097561	0.6585366	0.7619048	0.3370787	0.2826087	0.2823529
<b>IV</b>	0.6153846	0.6153846	0.6500000	0.2588235	0.2500000	0.2716049
<b>XV</b>	0.6410256	0.6410256	0.6750000	0.2823529	0.2500000	0.2716049
<b>VIII</b>	0.6750000	0.7250000	0.6341463	0.3678161	0.2888889	0.2650602
<b>XIII</b>	0.6666667	0.6410256	0.5750000	0.3764706	0.3181818	0.2716049
<b>XIV</b>	0.7088608	0.6582278	0.5925926	0.3488372	0.2921348	0.2682927
<b>XVI</b>	0.6923077	0.6666667	0.6000000	0.3529412	0.2954545	0.2716049
<b>XII</b>	0.7012987	0.6753247	0.6075949	0.3571429	0.2988506	0.2750000
<b>XVII</b>	0.7435897	0.6666667	0.6000000	0.4235294	0.3409091	0.2962963
<b>II</b>	0.6024096	0.6506024	0.7294118	0.3111111	0.2795699	0.2790698
<b>XIX</b>	0.5476190	0.5952381	0.6744186	0.2637363	0.2978723	0.2528736
<b>XX</b>	0.5609756	0.5365854	0.5952381	0.3146067	0.3478261	0.3058824
<b>XVIII</b>	0.6923077	0.6153846	0.5500000	0.3764706	0.2727273	0.2222222
	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>XV</b>	<b>VIII</b>	<b>XIII</b>	
<b>V</b>	1.0000000					
<b>III</b>	0.6823529	1.0000000				
<b>IV</b>	0.6172840	0.7209302	1.0000000			
<b>XV</b>	0.6419753	0.7441860	0.9756098	1.0000000		
<b>VIII</b>	0.6024096	0.6363636	0.6428571	0.6666667	1.0000000	
<b>XIII</b>	0.6172840	0.5581395	0.6097561	0.6341463	0.7619048	1.0000000
<b>XIV</b>	0.6341463	0.5977011	0.6024096	0.6265060	0.7529412	0.8915663
<b>XVI</b>	0.6419753	0.6279070	0.6341463	0.6585366	0.7380952	0.8536585
<b>XII</b>	0.6500000	0.5882353	0.6666667	0.6913580	0.7469880	0.8888889
<b>XVII</b>	0.6172840	0.6279070	0.5853659	0.6097561	0.6666667	0.7317073
<b>II</b>	0.6744186	0.7252747	0.6666667	0.6896552	0.6067416	0.5747126
<b>XIX</b>	0.6436782	0.6739130	0.6136364	0.6136364	0.5777778	0.5454545
<b>XX</b>	0.6352941	0.6222222	0.6046512	0.6046512	0.5227273	0.5348837
<b>XVIII</b>	0.6172840	0.5581395	0.5365854	0.5609756	0.6190476	0.6341463
	<b>XIV</b>	<b>XVI</b>	<b>XII</b>	<b>XVII</b>	<b>II</b>	<b>XIX</b>
<b>XIV</b>	1.0000000					
<b>XVI</b>	0.9397590	1.0000000				
<b>XII</b>	0.9268293	0.9629630	1.0000000			
<b>XVII</b>	0.7951807	0.8048780	0.7901235	1.0000000		
<b>II</b>	0.5909091	0.5977011	0.6046512	0.5977011	1.0000000	
<b>XIX</b>	0.5393258	0.5454545	0.5517241	0.5909091	0.6666667	1.0000000
<b>XX</b>	0.5517241	0.5581395	0.5647059	0.5581395	0.5934066	0.7173913
<b>XVIII</b>	0.6506024	0.6585366	0.6666667	0.7804878	0.5287356	0.5681818
	<b>XX</b>	<b>XVIII</b>				
<b>XX</b>	1.0000000					
<b>XVIII</b>	0.5348837	1.0000000				

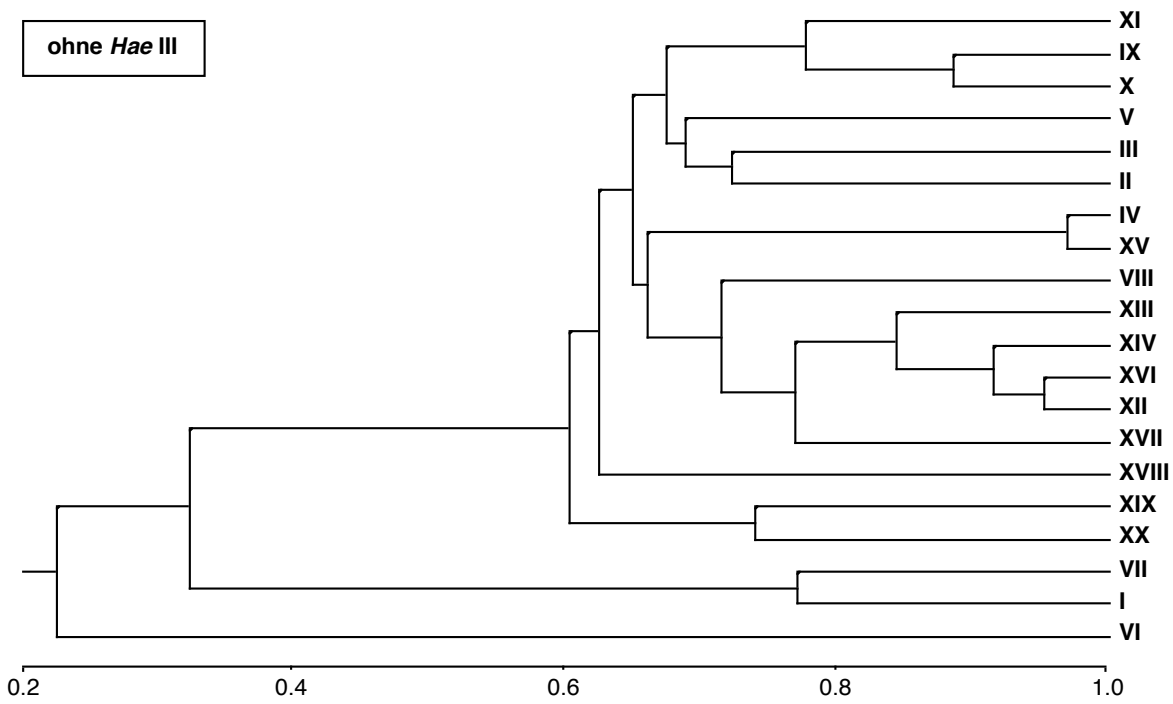
## Anhang XII

### UPGMA-Dendrogramme der RFLP-Daten mit „Enzym-Jackknifing“

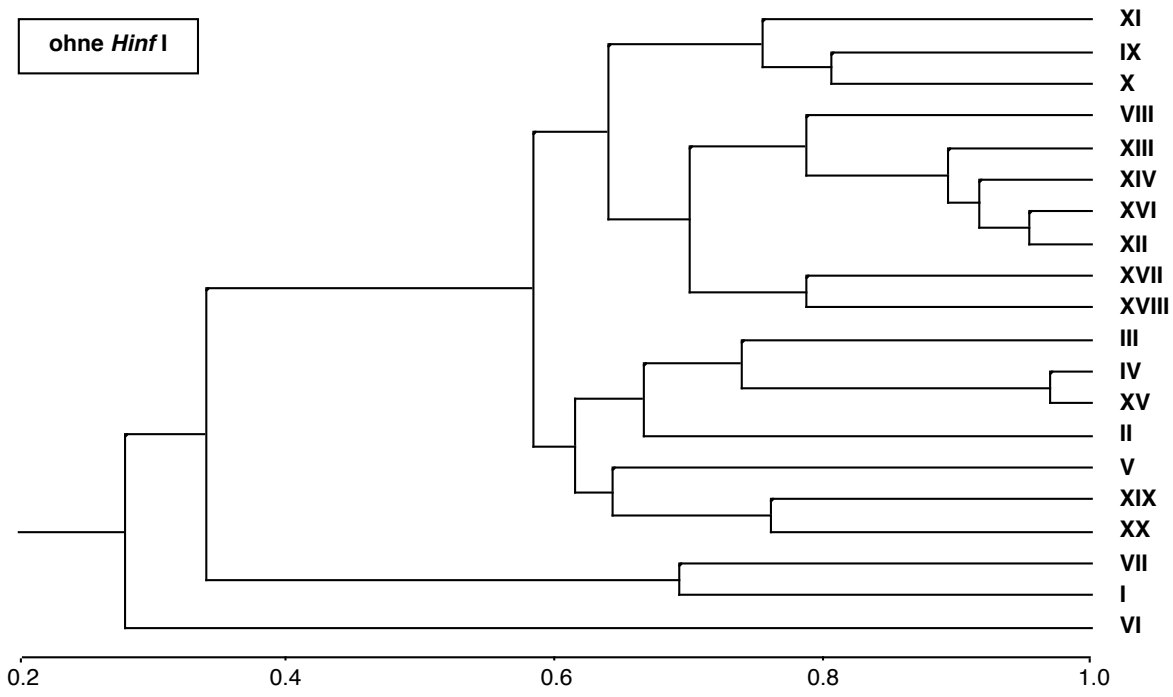
Mit Hilfe des DICE-Koeffizienten wurden aus der 0/1-Matrix (Tab.3.1.3.3-1) verschiedene UPGMA-Dendrogramme aus den Datensätzen von jeweils fünf der sechs Enzyme errechnet. Es wurde bei jedem Dendrogramm der Datensatz eines Enzyms nicht berücksichtigt („Enzym-Jackknifing“).

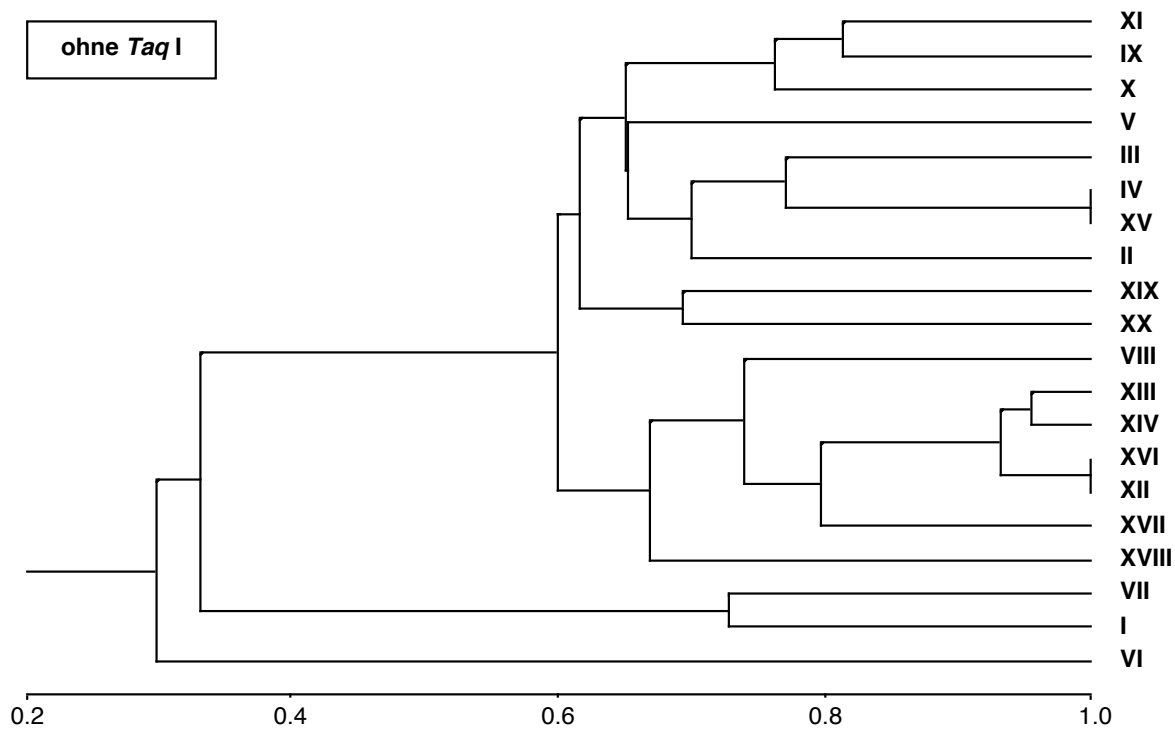
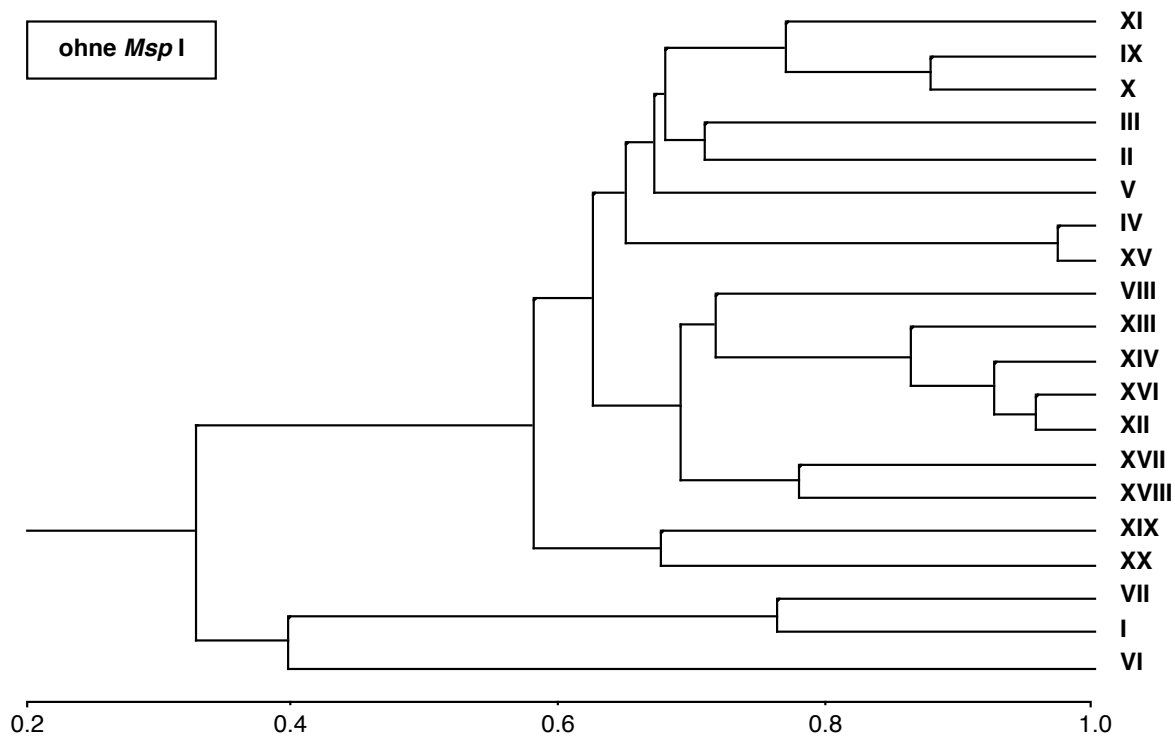


ohne *Hae* III



ohne *Hinf* I







## Anhang XIII

### Alignment der Domäne I der 26S rDNA der untersuchten Stämme mit *Exobasidium*-Referenzsequenzen aus GENBANK

In der vorliegenden Arbeit erstellte Partialsequenzen der 26S rDNA wurden in diesem Alignment mit 19 Referenzsequenzen von *Exobasidium*-Arten aus GENBANK homologisiert. Das Alignment entspricht, bezogen auf *Saccharomyces cerevisiae*, der 26S rDNA von Position 57 bis 612.

Die hier erstellten Sequenzen sind mit den Stammnummern gekennzeichnet, für die GENBANK-Einträge (siehe Kapitel 2.3.4.3.1) sind die Artnamen angegeben. Alignmentpositionen, die mit der Sequenz von *E. japonicum* identisch sind = „•“, fehlende Daten = „?“ , Gap = „-“. Direkt untereinander stehende Sequenzen, die durch Schattierung in einem Block zusammengefaßt sind, zeigen beim Vergleich zweier Sequenzen maximal zwei unterschiedliche Alignmentpositionen.



E.japonicum	CGAGAGATGT	TTTCCGCGTT	GGACCACGTA	CAAGTTCCTT	GGAATAGGAT	GTCATAGAGG	GTGAAAATCC	CGTACTTGAT	GTGGA-CGCC	CAGT-GCTTT
PB 3684	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
RBF 724	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
E.shiraianum	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PB 4898-18	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
E.rhododendri	.....	.....C.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PB 4380	.....	.....C.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PB 5634	.....	.....C.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
FO 24040-2	.....	.....C.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PB 4381	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A.
FO 31767	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A.
E.yoshinagai	.....A.	.....	.....	.....T.	.....A.	.....	.....	.....	.....	.....TA.
E.reticulatum	.....A.	.....A	.....T.	.....G.	.....C.	.....G.C.	.....	.....A.	.....	.....TA.
E.symploci-japonicae	.....	.....G	A.....	.....T.	.....	.....G.C.	.....	.....C	.....	.....CA.
E.gracile	.....A.	.....CG	.....T.	.....G.	.....C.	.....G.C.	.....	.....C.	.....A.C.	.....C.C.
E.rostrupii	.....T.	.....C.	.....	.....G.	.....C.	.....	.....	.....	.....	.....
PB 3275	.....T.	.....C.	.....	.....G.	.....C.	.....	.....	.....	.....	.....
PB 3277	.....T.	.....C.	.....	.....G.	.....C.	.....	.....	.....	.....	.....
RBF 746	.....T.	.....C.	.....	.....G.	.....C.	.....	.....	.....	.....	.....
FO 31777	.....T.	.....C.	.....	.....G.	.....C.	.....	.....	.....	.....	.....
E.bisporum	.....T.	.....C.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
E.arescens	.....T.	.....C.	.....	.....G.	.....C.	.....	.....	.....	.....	.....
PB 1828	.....T.	.....C.	.....	.....G.	.....C.	.....	.....	.....	.....	.....
E.pieridis-ovalifoliae	.....A.T.	.....C.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
E.pachysporum	.....T.	.....C.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PB 4153	.....T.	.....C.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
E.oxycocci	.....T.	.....C.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
E.sundstroemii	.....TA.	G.....C.	.....A.	R.....	C.W.....	.....	.....G.	.....	.....	.....
E.myrtilli	.....T.	.....C.	.....	.....	.....	.....	.....G.	.....	.....	.....
E.karstenii	.....T.	.....C.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....C
RBF 729	.....T.	.....C.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....C
E.vaccinii AF009858	.....T.	.....T.C.	.....GA.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....C T.
E.cf.vaccinii AF487398	.....T.	.....T.C.	.....GA.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....C T.
CBS 183.56	.....T.	.....T.C.	.....GA.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....C T.
PB 3385	.....T.	.....T.C.	.....GA.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....C T.
PB 4143	.....T.	.....T.C.	.....GA.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....C T.
RBF 727	.....T.	.....T.C.	.....GA.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....C T.
RBF 763	.....T.	.....T.C.	.....GA.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....C T.
RBF 765	.....T.	.....T.C.	.....GA.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....C T.
E.vaccinii AJ406400	.....T.	.....T.C.	.....GA.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....C T.
PB 383	.....T.	.....T.C.	.....T.	.....	.....C	.....	.....G.	.....	.....C A..C.T.	.....
PB 393	.....T.	.....T.C.	.....T.	.....	.....C	.....	.....G.	.....	.....C A..C.T.	.....
PB 3276	.....T.	.....T.C.	.....T.	.....	.....C	.....	.....G.	.....	.....C A..C.T.	.....
PB 2857e	.....TC.	.....C.	.....T.	.....C.	.....GC	.....	.....G.	.....	.....C A.....T.	.....
PB 4898-9	.....TC.	.....C.	.....T.	.....C.	.....GC	.....	.....G.	.....	.....C A.....T.	.....
RBF 726	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	GC A...G... -..A....

	250*										300*
E.japonicum	GTGATACGTC	TTCGAAGAGT	CGAGTTGTTT	GGGAATGCAG	CTCAAAATGG	GTGGTAAATT	CCATCTAAAG	CTAAATATTG	GGGAGAGACC	GATAGCGAAC	
PB 3684	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
RBF 724	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
E.shiraianum	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
PB 4898-18	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
E.rhododendri	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
PB 4380	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
PB 5634	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
FO 24040-2	.....N.NN.	NN.N..N.N.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
PB 4381	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
FO 31767	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
E.yoshinagai	.....A.T	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
E.reticulatum	.....A.T	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
E.symploci-japonicae	.....A..	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
E.gracile	.....A.T	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
E.rostrupii	.....G.A..	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
PB 3275	.....G.A..	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
PB 3277	.....G.A..	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
RBF 746	.....G.A..	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
FO 31777	.....G.A..	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
E.bisporum	.....A..	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
E.arescens	.....A..	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
PB 1828	.....A..	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
E.pieridis-ovalifoliae	.....A..	.....A..	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
E.pachysporum	.....A..	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
PB 4153	.....A..	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
E.oxycocci	.....A..	A.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
E.sundstroemii	.....A..	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
E.myrtilli	.....A..	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
E.karstenii	.....A..	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
RBF 729	.....A..	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
E.vaccinii AF009858	.....A..	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
E.cf.vacinii AF487398	.....A..	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
CBS 183.56	.....A..	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
PB 3385	.....A..	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
PB 4143	.....A..	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
RBF 727	.....A..	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
RBF 763	.....A..	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
RBF 765	.....A..	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
E.vaccinii AJ406400	.....A..	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
PB 383	.....AA.	C..A.C.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
PB 393	.....AA.	C..A.C.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
PB 3276	.....AA.	C..A.C.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
PB 2857e	.....AGG	C..A.C.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
PB 4898-9	.....AGG	C..A.C.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
RBF 726	.....CT	..T.....	.....	.....	.....	.....G	.....G.	.....	.....	.....	

	350*										400*
E.japonicum	AAGTACCGTG	AGGGAAAGAT	GAAAAGCACT	TTGGAAAGAG	AGTTAAACAG	TACGTGAAAT	TGTCAAAAGG	GAAGCATTTG	AAGTCAGACG	TGTATTTCAG	
PB 3684	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
RBF 724	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
E.shiraianum	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
PB 4898-18	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
E.rhododendri	.....	.....	.....	.....G.....	.....G.....	.....	.....	.....	.....	.....G.....	
PB 4380	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....C.G.....	
PB 5634	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....G.....	
FO 24040-2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....G.....	
PB 4381	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....G.....	
FO 31767	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....G.....	
E.yoshinagai	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....GT.....	
E.reticulatum	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....G.....	
E.symploci-japonicae	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....C.A.....	.....A.....	.....CGT.....	
E.gracile	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A.....	.....	.....G.....	
E.rostrupii	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....GT.....	
PB 3275	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....GT.....	
PB 3277	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....GT.....	
RBF 746	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....GT.....	
FO 31777	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....GT.....	
E.bisporum	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A.....	.....	.....GT.....	
E.arescens	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....GT.....	
PB 1828	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....GT.....	
E.pieridis-ovalifoliae	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A.....	.....	.....GT.....	
E.pachysporum	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....GT.....	
PB 4153	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....GT.....	
E.oxycocci	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
E.sundstroemii	.....	.....	.....	.....G.....	.....G.....	.....	.....G.....	.....	.....	.....C.G.....	
E.myrtilli	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....G.....	
E.karstenii	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
RBF 729	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
E.vaccinii AF009858	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
E.cf.vaccinii AF487398	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
CBS 183.56	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
PB 3385	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
PB 4143	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
RBF 727	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
RBF 763	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
RBF 765	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
E.vaccinii AJ406400	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
PB 383	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....GC.....	.....T.TTA.....	.....CT.GCTG.....	
PB 393	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....GC.....	.....T.TTA.....	.....CT.GCTG.....	
PB 3276	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....GC.....	.....T.TTA.....	.....CT.GCTG.....	
PB 2857e	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....C.G.....	.....T.T.A.....	.....CT.GC.T.....	
PB 4898-9	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....C.G.....	.....T.T.A.....	.....CT.GC.T.....	
RBF 726	.....A.....	.....T.....	.....A.....	.....A.NN.....	.....	.....	.....	.....C.....	.....GG.AG.....	.....G.....GA.....	.....CG.C.TG.....

	450*					500*				
E.japonicum	TATTCAGCCT	T-GCTTTT--	GCTTGGTGTA	TTTGCTG-TC	GTACAGGCCA	ACATCAGTTT	TGAGTGACGG	ATAAGGGTAG	AGAGAATGTG	GCA-CCTTCG
PB 3684	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
RBF 724	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
E.shiraianum	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PB 4898-18	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
E.rhododendri	.....	.....	.....	.....A	.....TT	.....	.....	.....	.....	.....T.C...
PB 4380	.....	.....	.....	.....A	.....T	.....	.....	.....	.....	.....T.C...
PB 5634	.....	.....	.....	.....A	.....T	.....	.....	.....	.....	.....T.C...
FO 24040-2	.....	.....	.....	.....A	.....T	.....	.....	.....	.....	.....T.C...
PB 4381	.....	.....	.....	.....A	T.....T	.....	C.....	.....	.....	.....T.C...
FO 31767	.....	.....	.....	.....A	T.....T	.....	C.....	.....	.....	.....T.C...
E.yoshinagai	.....	.....	.....	.....A	A T.....	.....G	.....	.....	.....	.....T...
E.reticulatum	.....	.....TT	.....	.....A	.....	.....	.....GT...T..	.....T	G.....	.....T.C.T.
E.symploci-japonicae	.....	.....C...	.....T	.....CA	.....	.....	.....GA..G...	.....T	G.G.....	.....C...
E.gracile	.....	.....	.....T	.....	.....	.....	.....C.....	.....T	G.....	.....C...
E.rostrupii	.....	.....	.....	.....A	T.....	.....	.....AC.....	.....T	TTG.....	.....T.C...
PB 3275	.....	.....	.....	.....A	T.....	.....	.....AC.....	.....T	TTG.....	.....T.C...
PB 3277	.....	.....	.....	.....A	T.....	.....	.....AC.....	.....T	TTG.....	.....T.C...
RBF 746	.....	.....	.....	.....A	T.....	.....	.....AC.....	.....T	TTG.....	.....T.C...
FO 31777	.....	.....	.....	.....A	T.....	.....	.....AC.....	.....T	TTG.....	.....T.C...
E.bisporum	.....	.....	.....	.....A	T.....	.....	.....A.....	.....T	TTG.....	.....T.C...
E.arescens	.....	.....	.....	.....A	T.....	.....	.....A.....	.....T	TTG.....	.....C...
PB 1828	.....	.....	.....	.....A	T.....	.....	.....A.....	.....T	TTG.....	.....C...
E.pieridis-ovalifoliae	.....	.....	.....	.....A	T.....	.....	.....A.....	.....T	TTG.....	.....T...
E.pachysporum	.....	.....	.....	.....A	T.....	.....	.....A.....	.....T	TA.....	.....T.C...
PB 4153	.....	.....	.....	.....A	T.....	.....	.....A.....	.....T	TA.....	.....T.C...
E.oxycocci	.....	.....TT	.....	.....T	T.....	.....	.....	.....	.....A.....A	.....T.
E.sundstroemii	.....	T.....	.....	.....C	T .C.....	.....	.....	.....T	G.G.....	.....C...
E.myrtilli	.....	.....	.....	.....	T.....	.....	.....	.....T	G.G.....	.....C...
E.karstenii	.....	.....	.....	.....	T.....	.....	.....	.....A	GAG.....	.....C...
RBF 729	.....	.....	.....	.....	T.....	.....	.....	.....A	GAG.....	.....C...
E.vaccinii AF009858	.....	.....	.....	.....	T.....	.....	.....	.....	GAG.....	.....C...
E.cf.vacinii AF487398	.....	.....	.....	.....	T.....	.....	.....	.....	GAG.....	.....C...
CBS 183.56	.....	.....	.....	.....	T.....	.....	.....	.....	GAG.....	.....C...
PB 3385	.....	.....	.....	.....	T.....	.....	.....	.....	GAG.....	.....C...
PB 4143	.....	.....	.....	.....	T.....	.....	.....	.....	GAG.....	.....C...
RBF 727	.....	.....	.....	.....	T.....	.....	.....	.....	GAG.....	.....C...
RBF 763	.....	.....	.....	.....	T.....	.....	.....	.....	GAG.....	.....C...
RBF 765	.....	.....	.....	.....	T.....	.....	.....	.....	GAG.....	.....C...
E.vaccinii AJ406400	.....	.....	.....	.....	T.....	.....	.....	.....	GAG.....	.....C...
PB 383	G.C.....	.....	.....C	...C.CA.GT	A.G....T.	G....G....	..TC..CT..	.....A	.AG...C...	.....C...
PB 393	G.C.....	.....	.....C	...C.CA.GT	A.G....T.	G....G....	..TC..CT..	.....A	.AG...C...	.....C...
PB 3276	G.C.....	.....	.....C	...C.CA.GT	A.G....T.	G....G....	..TC..CT..	.....A	.AG...C...	.....C...
PB 2857e	G.C.....	.....	.....C	...C.A..GT	ACG....T.	G....G....	..C..CT..	.....GA	GAG.....	.....C...
PB 4898-9	G.C.....	.....	.....C	...C.A..GT	ACG....T.	G....G....	..C..CT..	.....GA	GAG.....	.....C...
RBF 726	G.....	.....	..C.....T	...C.CA.AG	C.G.....	..G..G....	..G.CACT..	.G.....	GAG...C...	...C.TC...

E.japonicum	GG-TGTGTTA	TAGCTCTTTA	CTGGATACGT	CGTTTGGGAC	TGAGGAACGC	AGCGCGC-CG	TAA-GGCAGA	CCCTCGGGTA	CTTT-CGCG-	CTTAGGATG
PB 3684	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
RBF 724	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
E.shiraianum	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PB 4898-18	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
E.rhododendri	.A.....	...T...W..	.....	.CY...N.G	.....C..N.	...N.T...N	C.....	.....	.....NA..	.....???????
PB 4380	.A.....	.....	.....	.....	.....	.....	C.....	A.....	.....	.....
PB 5634	.A.....	.....	.....	.....	.....	.....	C.....	.....	.....	.....
FO 24040-2	.A.....	.....	.....	.....	.....	.....	C..N....	.....	.....?????	.....?????????
PB 4381	.A.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
FO 31767	.A.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
E.yoshinagai	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C.....	G.T.....	.....	.....
E.reticulatum	.A.....	.....A..	.....A.	T.AC.....	.....	.....	.....	.T.....	.....T.....	.....?
E.symploci-japonicae	.....	...C..G..	..A.....	...C.....	.....	.....	.....G	.....C.	.....	.....
E.gracile	.....	.....A..	.....	..A.....	.....	.....	.....	.T.....	.....	.....
E.rostrupii	.A.....	...CT..	.....	.....	.....	.....	C.....	.T.....	.....	.....A????
PB 3275	.A.....	...CT..	.....	.....	.....	.....	C.....	.T.....	.....	.....
PB 3277	.A.....	...CT..	.....	.....	.....	.....	C.....	.T.....	.....	.....
RBF 746	.A.....	...CT..	.....	.....	.....	.....	C.....	.T.....	.....	.....
FO 31777	.A.....	...CT..	.....	.....	.....	.....	C.....	.T.....	A.....	.....
E.bisporum	.A.....	...CT..	.....	.....	.....	.....	.....	.T.....	.....	.....
E.arescens	.....	...CT..	.....	.....	.....	.....	.....	.T.....	.....	.....
PB 1828	.....	...CT..	.....	.....	.....	.....	.....	.T.....	.....	.....???
E.pieridis-ovalifoliae	A.....	...CT..	.....	.....	.....	.....	.....	.T.....	.....	.....
E.pachysporum	.A.....	...T..	.....	.....	.....	...T.....	.....	.T.T.....	.....A.....	.....
PB 4153	.A.....	...T..	.....	.....	.....	...T.....	.....	.T.T.....	.....A.....	.....
E.oxycocci	.....	...T..	.....	.....	.....	.....	.....	.T.....	.....	.....
E.sundstroemii	.....	...C..A..	.....	.....	...C.....	.....	.....	.T.....	.....T.....	.....T??
E.myrtilli	.....	...C..A..	.....	.....	.....	.....	.....	.T.....	.....	.....
E.karstenii	.....	...CT.C.	.....	.....	.....	.....	C.....	.T.....	.....	.....
RBF 729	.....	...CT.C.	.....	.....	.....	.....	C.....	.T.....	.....	.....
E.vaccinii AF009858	.....	...CTC..	.....	.....	...A.....	.....	.....	.T.....	.....	.....
E.cf.vaccinii AF487398	.....	...CTC..	.....	.....	...A.....	.....	.....	.T.....	.....	.....
CBS 183.56	.....	...CTC..	.....	.....	...A.....	.....	.....	.T.....	.....	.....
PB 3385	.....	...CTC..	.....	.....	...A.....	.....	.....	.T.....	.....	.....
PB 4143	.....	...CTC..	.....	.....	...A.....	.....	.....	.T.....	.....	.....
RBF 727	.....	...CTC..	.....	.....	...A.....	.....	.....	.T.....	.....	.....
RBF 763	.....	...CTC..	.....	.....	...A.....	.....	.....	.T.....	.....	.....
RBF 765	.....	...CTC..	.....	.....	...A.....	.....	.....	.T.....	.....	.....
E.vaccinii AJ406400	.....	...CTC..	.....	.....	...A.....	.....	.....	.T.....	.....	.....
PB 383	.....	...CT.C..	.....AG	..GAC.....	C.....	.....T	C.C...G..	.T.....	.C.....	.....
PB 393	.....	...CT.C..	.....AG	..GAC.....	C.....	.....T	C.C...G..	.T.....	.C.....	.....
PB 3276	.....	...CT.C..	.....AG	..GAC.....	C.....	.....T	C.C...G..	.T.....	.C.....	.....
PB 2857e	.....	...CT.C..	.....G.AG	.AG.....	C.....	.....T	.T.T...G..	.T.....	.C.....	.....
PB 4898-9	.....	...CT..C.	.....G.AG	.AG.....	C.....G..	.....T	.T.T...G..	.T.....	.C.....	.....
RBF 726	..G.....	...CTCC..	.....AG	..ACC.A...	C.....	.....TA.T..	...GA..G.G	.T.TT..C.	.C...TA...	.....GC.

## Anhang XIV

### Alignment der Domäne I der 26S rDNA der Ustilaginomycetes

Ausgewählte Vertreter von in der vorliegenden Arbeit erstellten Partialsequenzen der 26S rDNA von *Exobasidium*-Stämmen und von *Exobasidium*-Referenzsequenzen aus GENBANK (siehe dazu Kapitel 3.4) wurden mit weiteren GENBANK-Einträgen von Vertretern der Ustilaginomycetes (siehe Kapitel 2.3.4.3.2) homologisiert. Dies Alignment umfaßt den Bereich von Position 41 bis 559 des in Anhang XIII abgedruckten Alignments der *Exobasidium*-Sequenzen.

Alignmentpositionen, die mit der Sequenz von *E. japonicum* identisch sind = „•“, fehlende Daten = „?“, Gap = „-“. Alignmentpositionen, die von der phylogenetischen Analyse ausgeschlossen wurden, sind durch \* gekennzeichnet.



E. japonicum	TGAAGCGGGA	TGAGCTCAA-	ATTTGAAAGC	TGG-CAG-TA	AT--GTCCGC	ATTGTAATCT
E. shiraianum	.....	.....	.....	.....	.....	.....
E. rhod.AF009856	.....	.....	.....	.....T.C.	.....	G.G.....
E. rhododendri a	.....	.....	.....	.....C.	.....	G.....
E. rhododendri b	.....	.....	.....	.....C.	.....	G.....
E. yoshinagai	.....	.....	.....	.....	.....	.....
E. oxycocci	.....	.....	.....	.....	.....	G.....
E. rostrupii	.....	.....	.....	.....C.	.....	.....
E. arescens	.....	.....	.....	.....C.	.....	G.....
E. pachysporum	.....	.....	.....	.....	.....	G.....
E. bisporum	.....	.....	.....	.....	.....	.....
E. pieridis-oval.	.....	.....	.....	.....	.....	G.....
E. vaccinii	.....	.....	.....	.....	.....	G.....
E. karstenii	.....	.....	.....	.....C.	.....	G.....
E. sundstroemii	.....	.....	.....	.....C.	.....	G.A.....
E. myrtilli	.....	.....	.....	.....C.	.....	G.....
E. gracile	.....	.....	.....	.....C.	.....C.	.....
E. reticulatum	.....	.....	.....	.....C	.....	.....
E. symploci-jap.	.....	.....	.....	.....C.	.....	G.....
Arcticomyces	.....	.....	.....G.	.....C.	.....	G.....
Muribasidiospora	.....	.....	.....	.....C.	.....	G.....
Graphiola phoen.	.....	A.....	.....Y.....	.....C.	.....	G.....
Graphiola cylind.	.....	A.....	.....	.....C.C.	.....G.	.....
Kordyana	.....	.....	.....	.....T.....C.	.....CA.	G.....
Dicellomyces	.....	.....	.....	.....C-.T	TG.....	.....
Clinoconidium	.....	.....	.....	.....CT.C.	CG.....	.....T.
Laurobasidium	.....	.....	.....	.....TT.C	CG.....	.....T.
Eballistra	.....	A.....	.....	.....CT.-	TG.....	G.A.....
Tilletiopsis min.	.....	.....	.....	.....CTT.T	TG.....	G.....
Georgefischeria	.....	A.....	.....	.....A.CT.T	CG.....	.....
Tilletiopsis ful.	.....	A.....	.....C.....	.....C.C.	.....G.....	.....C..
Tilletiopsis fla.	.....	A.....	.....	.....C.C.	.....G.....	.....
Tilletiaria	.....	A.....	.....	.....C.C.	.....G.....	.....
Jamesdicksonia	.....	.....	.....	.....C-.C	TG.....	.....
Rhamphospora	.....	A.....	.....AG.	.....C.T	TGCT.....	G.....
Doassansia	.....	A.....	.....	.....C.T	CGCT.....	G.....
Doassinga	.....	A.....	.....	.....C.T	CGCT.....	G.....
Nannfeldtiomyces	.....	.....	.....	.....C.T	CGCT.....	G.....
Erratomyces	.....	.....	.....	.....TC.T	CGGT.....	.....
Conidiosporomyces	.....	.....	.....	.....GCC.T	TGGT.....	.....
Tilletia	.....	.....	.....	.....CC.T	TGGT.....	.....
Ingoldiomyces	.....	.....	.....	.....CC.T	TGGT.....	.....
Malassezia fur.	.....A....	A.....	.....GA.	.....T.-C.T	CGGTA.....	G.....C..
Malassezia sym.	C.....	A.....	.....	.....CC.C	CGGT.....	G.....
Tilletiopsis alb.	.....	A.....	.....	.....GCC.T	CGGT.....	.....
Microstroma alb.	.....	A.....	.....	.....GCC.T	CGGC.....	G.....
Rhodotorula	.....	A.....S..	.....	.....GCC.T	CGGC.....	G.....
Microstroma jug.	.....	A.....	.....	.....T.CC.T	CGGT.C....	G.....
Symptodiomyces	.....	A.....	.....	.....T.CC.T	CGGT.C....	G.....
Volvocisporium	.....	A.....	.....C...T.	.....T.CC.T	TGGT.C....	G.....C..
Tilletiopsis pal.	.....	A.....	.....	.....GTC.T	CGAC.....	.....
Entyloma polysp.	.....	A.....	.....	.....TGTGCC.T	TGGTAA....	.....
Entyloma calend.	.....	A.....	.....	.....T.TGCC.T	TGGTAA....	.....
Entyloma ficariae	.....	A.....	.....	.....T.TGCC.T	TGGTAA....	.....
PB 2857e	.....	A.....	.....	.....T.TGCC.T	TGGTAA....	.....
Tilletiopsis was.	.....	A.....	.....	.....GCC.T	CGGC.....	.....
PB 393	.....	A.....	.....	.....GTC.T	CGGC.....	.....
Sporisorium	.....A....	A.....C...G	.....-	.....GTC.T	CGGC.....	.....
Ustilago	.....A....	A.....C...G	.....-	.....GTC.T	CGGC.....	.....-
RBF 726	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????
Pseudozyma	.....A....	A.....C...G	.....-	.....GTC.T	CGGC.....	.....
Doassansiopsis	.....A....	A.....C...G	T.-.....	.....CC.T	CGGT.....	.....
Entorrhiza caspa.	.....	A.....G	.....T.	.....CC.T	TGGT.....A	G.....T.
Entorrhiza asch.	.....	A.....	.....T.	.....CC.T	TGGT.....A	G.....T.

<i>E. japonicum</i>	CGAGAGATGT	TTTCCGCGTT	GGACCACGTA	CAAGTTCCTT	GGAATAGGAT	GTCATAGAGG
<i>E. shiraianum</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. rhod.</i> AF009856	.....	.....C.	.....	.....	.....	.....
<i>E. rhododendri a</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. rhododendri b</i>	.....	.....C.	.....	.....	.....	.....
<i>E. yoshinagai</i>	.....A....	.....	.....	.....T...	.....A...	.....
<i>E. oxycocci</i>	.....T...	.....C.	.....	.....	.....	.....
<i>E. rostrupii</i>	.....T...	.....C.	.....	.....G...	.....C.	.....
<i>E. arescens</i>	.....T...	.....C.	.....	.....G...	.....C.	.....
<i>E. pachysporum</i>	.....T...	.....C.	.....	.....	.....	.....
<i>E. bisporum</i>	.....T...	.....C.	.....	.....	.....	.....
<i>E. pieridis-oval.</i>	...A..T...	.....C.	.....	.....	.....	.....
<i>E. vaccinii</i>	.....T...	.....T.C.	....GA...	.....	.....	.....
<i>E. karstenii</i>	.....T...	.....C.	.....	.....	.....	.....
<i>E. sundstroemii</i>	.....TA..	G.....C.	.....A..	R.....	C.W.....	.....
<i>E. myrtilli</i>	.....T...	.....C.	.....	.....	.....	.....
<i>E. gracile</i>	.....A....	.....CG	....T....	.....G...	.....C.	.....
<i>E. reticulatum</i>	.....A....	.....A	.....T...	.....G...	.....C.	.....
<i>E. symploci-jap.</i>	.....	.....G	A.....	..T.....	.....	.....
<i>Arcticomycetes</i>	.....A....	.....T.C.	.....	.....	.....	.....
<i>Muribasidiopora</i>	.....A....	.....T.C.	.....T...	T.....	.....	.....
<i>Graphiola phoen.</i>	.....CG...	.....T.C.	.....GT.G.	.....T.C.	.....G.A.	.....
<i>Graphiola cylind.</i>	.....AG...	.....C.	.....T.G.	.....C.	.....G.	.....
<i>Kordyana</i>	.....A....	.....T.C.	..W..T.G.	.....	.....	.....
<i>Dicellomyces</i>	.....TG...	.....T.C.	A...GT.G.	.....	.....T.	.....
<i>Clinoconidium</i>	.....	C.....	.....	.....CT.C.	....AG.AG.	.....
<i>Laurobasidium</i>	.....C....	.....	.....	.....T.C.	....AG.AG.	.....
<i>Eballistra</i>	.....AG...	.....T..C	.....G....	.....C....	.....GC	A..G.....
<i>Tilletiopsis min.</i>	.....AG...	.....T..	.....G....	.....C....	.....GC	..G.....
<i>Georgefischeria</i>	.....AGC..	..G....AC	..G.TG...	.....C....	.....GC	..G.....
<i>Tilletiopsis ful.</i>	.....AG...	.....C.	....TGT...	.....C....	.....GC	..G.....
<i>Tilletiopsis fla.</i>	.....AG...	.....C.	....TGT...	.....C....	.....GC	..G.....
<i>Tilletiaria</i>	.....AG...	.....	....TG...	.....C....	.....GC	..G.....
<i>Jamesdicksonia</i>	.....AG...	.....T.CC	....TTG...	.....C....	.....GC	..G.....
<i>Rhamphospora</i>	.T...GCA.	.....T.CC	.....T...	.....	.....C...C	..GC....
<i>Doassansia</i>	.....AG...	.....CC	.....G....	.....	.....C....	.....
<i>Doassinga</i>	.....G....	.....C.	....T.G...	.....	.....C....	.....
<i>Nannfeldtiomyces</i>	.....G....	.....CC	.....G....	.....	.....C....	.....
<i>Erratomyces</i>	.....AG...	....T.T..	..GT..T.C.	.....C....	....A...GC	A...A....
<i>Conidiosporomyces</i>	.....AG.AG	.A..T.T.C.	..G...T...	.....	.....C	A...G....
<i>Tilletia</i>	.....AG.AG	....T.T.CC	.....T...	.....	.....C	A...G....
<i>Ingoldiomyces</i>	.....AG.AG	....T.T.CC	.....T...	.....	.....C	A...G....
<i>Malassezia fur.</i>	.....C.C..	.....T.CG	.CG.T.T.G.	.....	.....C...C	A..G.....
<i>Malassezia sym.</i>	.....CG...	.....T.CG	.CT.T.T.G.	.....C....	.....C...GC	A..G.....
<i>Tilletiopsis alb.</i>	A.....G...	.....CC	.....G....	.....	.....C....	.....
<i>Microstroma alb.</i>	.....AG...	.....T.C.	.....T...	.....	.....C	.....
<i>Rhodotorula</i>	.....AG...	.....T.C.	.....T...	.....	.....C	.....
<i>Microstroma jug.</i>	.....AG...	.....T.C.	.....T...	.....	.....C	.....
<i>Sympodiomyces</i>	.....AG...	.....T.C.	.....T...	.....	.....C	.....
<i>Volvocisporium</i>	.....AG...	.....T..	.....T...	.....	.....C	.....
<i>Tilletiopsis pal.</i>	.....AG...	.....T..	.....T...	.....	.....C...C	.....
<i>Entyloma polysp.</i>	.....TC...	A.A..K..C.	.....T...	.....C....	.....GC	.....T.
<i>Entyloma calend.</i>	.....TC...	.....C.	.....T...	.....C....	.....GC	.....
<i>Entyloma ficariae</i>	.....TC...	.....C.	.....T...	.....C....	.....GC	.....
PB 2857e	.....TC...	.....C.	.....T...	.....C....	.....GC	.....
<i>Tilletiopsis was.</i>	.....T...	.....T.C.	.....T...	.....	.....C	.....
PB 393	.....T...	.....T.C.	.....T...	.....	.....C	.....
<i>Sporisorium</i>	.A...AG...	.....T.C	.....T.CC	T...C....	....A...GC	A.....
<i>Ustilago</i>	.A...AG...	.....T.C	.....T.CC	T...C....	....A...-C	A.....
RBF 726	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????
<i>Pseudozyma</i>	.A...AG...	.....T.C	.....A.CC	T...C...C.	....AG..GC	A.....
<i>Doassansiopsis</i>	.....AG...	..N...C.	.....G....	.....C....	.....GC	A.....
<i>Entorrhiza caspa.</i>	.T...G...	....A.TAC.	T.G.T.G...	T..A.C.T..	....C...G.	A.....
<i>Entorrhiza asch.</i>	.T...G...	....A.T.C.	TAG.T.G...	T..A.C.T..	....C...G.	A.....

<i>E. japonicum</i>	GTGAAAATCC	CGTACTTGAT	GTGGACGCC	AGT-GCTTTG	TGATACGTCT	TCGAAGAGTC
<i>E. shiraianum</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. rhod.AF009856</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. rhododendri a</i>	.....	.....	.....	.A.....	.....	.....
<i>E. rhododendri b</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. yoshinagai</i>	.....	.....	.....	.A.....	.....A.T.	.....
<i>E. oxycocci</i>	.....	.....	.....	.....	.....A.A	.....
<i>E. rostrupii</i>	.....	.....	.....	.....	.....G.A..	.....
<i>E. arescens</i>	.....	.....	.....	.....	.....A..	.....
<i>E. pachysporum</i>	.....	.....	.....	.....	.....A..	.....
<i>E. bisporum</i>	.....	.....	.....	.....	.....A..	.....
<i>E. pieridis-oval.</i>	.....	.....	.....	.....	.....A..	.....A....
<i>E. vaccinii</i>	.....	.....C	T.....	.....	.....A..	.....
<i>E. karstenii</i>	.....	.....C	.....	.....	.....A..	.....
<i>E. sundstroemii</i>	...G.....	.....	.....	.....	.....A..	.....
<i>E. myrtilli</i>	...G.....	.....	.....	.....	.....A..	.....
<i>E. gracile</i>	...G.C..	...C.....	..A.C.....	C.C.....	.....A.T.	.....
<i>E. reticulatum</i>	...G.C..	.....	A.....	TA.....	.....A.T.	.....
<i>E. symploci-jap.</i>	...G.C..	.....C	.....	CA.....	.....A..	.....
<i>Arcticomyces</i>	.....	.....	.....	.....	.....A.T.	.....
<i>Muribasidiospora</i>	.....	.....C	A.....	...A.....	.....A.T.	.....
<i>Graphiola phoen.</i>	.....C..	.....CC	.C.....	.....	.....G.CG.	.....
<i>Graphiola cylind.</i>	...T.C..	.....C.	.....	.....	.....ACT.	..A.....
<i>Kordyana</i>	...G.C..	...CT...CC	A.....	.....	.....A.T.	.....
<i>Dicellomyces</i>	...G.C..	.....A.CC	.C...T...T	.....	.....ACG.	.....
<i>Clinoconidium</i>	...T.C..	.....	.....	.AG.....	.....A..	.....C.....
<i>Laurobasidium</i>	...T.C..	.....	.....	.AG.....	.....	.....C.....
<i>Eballistra</i>	...G.....	.....C	.C.C-AG..	.A.....	.....CTC	..C.C.....
<i>Tilletiopsis min.</i>	...G.....	.....C	...C-AG..	.A.....	.....ACTC	..C.C.....
<i>Georgefischeria</i>	...G.....	.....	.CA..TC.A	C..T.....	.....CTC	..C.C.....
<i>Tilletiopsis ful.</i>	...G.....	.....	.CA.C-C..	.....	.....ACTC	..C.C.....
<i>Tilletiopsis fla.</i>	...G.....	.....	.CA.C-C..	.....	.....ACTC	..C.C.....
<i>Tilletiaria</i>	...G.....	.....	.CA.C-CA..	.AC.....	.....ACTC	..C.C.....
<i>Jamesdicksonia</i>	...G.....	.....C	.CA.G-CT..	G.....	.....ACTC	..C.....
<i>Rhamphospora</i>	...G.C..	.....C	A...C-A.	G.....	.....T.C.C	..C.C.....
<i>Doassansia</i>	...G.C..	.....C	...C-....	G.....	.....AC.C	..A.C.....
<i>Doassinga</i>	...G.C..	.....C	.C.C-C-....	.....	.....C.C	..C.C.....
<i>Nannfeldtiomyces</i>	...G.C..	.....C	.C.C-C-....	G.....	.....AC.C	..A.C.....
<i>Erratomyces</i>	...T.....	.....GC	A..A.-TT..	.A.....	.....CTC	..T.T.....
<i>Conidiosporomyces</i>	...G.....	.....C	A...-TT..	T.....	.....CT.CTC	..T.T.....
<i>Tilletia</i>	...G.....	.....C	A...-C..	G.....	.....CT.CTC	..T.T.....
<i>Ingoldiomyces</i>	...G.....	.....C	A...-C..	G.....	.....CT.CTC	..T.T.....
<i>Malassezia fur.</i>	.....	.....CC	A...T.TA	C.....	C.....GC	..T.....
<i>Malassezia sym.</i>	.....	.....CC	A...T.TA	C.....	.....ACGC	..T.....
<i>Tilletiopsis alb.</i>	...G.....	.....	.C...T...G.	.....	.....AC.C	..C.C.....
<i>Microstroma alb.</i>	.....	...C...C	A.....	.....	.....CTC	..C.C.....
<i>Rhodotorula</i>	.....	...C...C	A.....	.....	.....CTC	..C.C.....
<i>Microstroma jug.</i>	.....	.....C	A.....	.....	.....ACTC	..C.C.....
<i>Sympodiomyces</i>	.....	.....C	A...T...	.....	.....ACTC	..C.C.....
<i>Volvocisporium</i>	.....	.....C	A...T...	.A.....	.....ACTC	..C.C.....
<i>Tilletiopsis pal.</i>	...G.....	.....C	A...T...	.A.....	.....CTC	..C.C.....
<i>Entyloma polysp.</i>	...G.....	.....C	A...C.T...	.T.....	.....AGGC	..A.C.....
<i>Entyloma calend.</i>	...G.....	.....C	A...C.T...	.....	.....AGGC	..A.C.....
<i>Entyloma ficariae</i>	...G.....	.....C	A...T...	.....	.....AGGC	..A.C.....
<i>PB 2857e</i>	...G.....	.....C	A...T...	.....	.....AGGC	..A.C.....
<i>Tilletiopsis was.</i>	...G.....	.....C	A...C...	.....	.....AA.C	..A.C.....
<i>PB 393</i>	...G.....	.....C	A...CT...	.....	.....AA.C	..A.C.....
<i>Sporisorium</i>	...T.....	.....A.GC	A...GCG..	C.AA.....	.....CT.	..T.C.....
<i>Ustilago</i>	...T.....	.....A.GC	A...GCG..	C.A.....	.....CT.	..T.....
<i>RBF 726</i>	??????????	??????GC	A...GCG..	C.A.....	.....CT.	..T.....
<i>Pseudozyma</i>	...T.....	.....A.GC	T...GCG..	C.AG.....	.....CT.	..T.....
<i>Doassansiopsis</i>	.....	.....C	T...AC.A	CAGG.T...	.....ACTC	..C.....
<i>Entorrhiza caspa.</i>	...G.....	...CT...C	C...-CTA-	...A.A..	.....A.A	..A.....
<i>Entorrhiza asch.</i>	...G.....	...CT...C	C.A.-TTA-	...A.A..	.....ACT.	.....

	GAGTTGTTTG	GGAATGCAGC	TCAAAATGGG	TGGTAAATTC	CATCTAAAGC	TAAATATTGG
<i>E. japonicum</i>						
<i>E. shiraianum</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. rhod.</i> AF009856	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. rhododendri a</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. rhododendri b</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. yoshinagai</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. oxycocci</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. rostrupii</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. arescens</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. pachysporum</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. bisporum</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. pieridis-oval.</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. vaccinii</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. karstenii</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. sundstroemii</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. myrtilli</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. gracile</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. reticulatum</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. symploci-jap.</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Arcticomycetes	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Muribasidiospora	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Graphiola phoen.	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Graphiola cylind.	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Kordyana	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Dicellomyces	.....	.....	.....G.....	.....	.....	.....
Clinoconidium	.....	.....	.....C.....	.....	.....	.....
Laurobasidium	.....	.....	.....C.....	.....	.....	.....
Eballistra	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Tilletiopsis min.	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Georgefischeria	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Tilletiopsis ful.	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Tilletiopsis fla.	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Tilletiaria	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Jamesdicksonia	.....	.....	.....	.....	.....	.....G..
Rhamphospora	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Doassansia	.....	.....	.....	.....	.....	.....C..
Doassinga	.....	.....	.....	.....	.....	.....C..
Nannfeldtiomyces	.....	.....	.....	.....	.....	.....C..
Erratomyces	.....	.....	.....	.....C.....	.....	.....
Conidiosporomyces	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Tilletia	.....	.....	.....	.....G.....	.....	.....
Ingoldiomyces	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Malassezia fur.	.....	.....T.....	.....	.....G.C.....	.....	.....C..
Malassezia sym.	.....	.....T.....	.....T.....	.....G.C.....	.....	.....C..
Tilletiopsis alb.	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Microstroma alb.	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Rhodotorula	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Microstroma jug.	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Sympodiomyces	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Volvocisporium	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Tilletiopsis pal.	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Entyloma polyp.	.....	.....	.....	.....	.....	.....G..
Entyloma calend.	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Entyloma ficariae	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PB 2857e	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Tilletiopsis was.	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PB 393	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Sporisorium	.....	.....	.....	.....G.....	.....G.....	.....
Ustilago	.....	.....	.....	.....G.....	.....G.....	.....
RBF 726	.....	.....	.....	.....G.....	.....G.....	.....
Pseudozyma	.....	.....	.....	.....G.....	.....G.....	.....
Doassansiopsis	.....	.....	.....	.....G.....	.....G.....	.....C.A
Entorrhiza caspa.	.....	.....	.....T.....	.....	.....	.....A..
Entorrhiza asch.	.....	.....	.....T.....	.....	.....	.....A..

<i>E. japonicum</i>	GGAGAGACCG	ATAGCGAACA	AGTACCGTGA	GGGAAAGATG	AAAAGCACTT	TGGAAAGAGA
<i>E. shiraianum</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. rhod.</i> AF009856	.....	.....	.....	.....	.....	....G.....
<i>E. rhododendri a</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. rhododendri b</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. yoshinagai</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. oxycocci</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. rostrupii</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. arescens</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. pachysporum</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. bisporum</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. pieridis-oval.</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. vaccinii</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. karstenii</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. sundstroemii</i>	.....	.....	.....	.....	.....	....G.....
<i>E. myrtilli</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. gracile</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. reticulatum</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. symploci-jap.</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Arcticomyces	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Muribasidiospora	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>Graphiola phoen.</i>	.....	....A....	.....	.....	.....	.....
<i>Graphiola cylind.</i>	.....	....A....	.....	.....	.....	.....
<i>Kordyana</i>	.....	....A....	.....	.....	.....	.....
<i>Dicellomyces</i>	.....	....A....	.....	.....	.....	.....
<i>Clinoconidium</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>Laurobasidium</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>Eballistra</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>Tilletiopsis min.</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>Georgefischeria</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>Tilletiopsis ful.</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>Tilletiopsis fla.</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>Tilletiaria</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>Jamesdicksonia</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>Rhamphospora</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>Doassansia</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>Doassinga</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>Nannfeldtiomyces</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>Erratomyces</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>Conidiosporomyces</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>Tilletia</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>Ingoldiomyces</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>Malassezia fur.</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>Malassezia sym.</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>Tilletiopsis alb.</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>Microstroma alb.</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>Rhodotorula</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>Microstroma jug.</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>Sympodiomyces</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>Volvocisporium</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>Tilletiopsis pal.</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>Entyloma polysp.</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....A.....
<i>Entyloma calend.</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>Entyloma ficariae</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PB 2857e	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>Tilletiopsis was.</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PB 393	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>Sporisorium</i>	.....	.....	....A....	T.....	....A....	..A.....
<i>Ustilago</i>	.....	.....	....A....	T.....	....A....	..A.....
RBF 726	.....	.....	....A....	T.....	....A....	..A..NN...
<i>Pseudozyma</i>	.....	.....	....A....	T.....	....A....	..A.....
<i>Doassansiopsis</i>	.....	.....	.....	.....	....A....	..A.....
<i>Entorrhiza caspa.</i>	C.....	.....	.....	.....	....A....	..A.....
<i>Entorrhiza asch.</i>	C.....	.....	.....	.....	....A....	..A.....

E. japonicum	GTAAACAGT	ACGTGAAATT	GTCAAAAGGG	AAGCATTGGA	AGTCAGACGT	GTATTTTCAGT
E. shiraianum	.....	.....	.....	.....	.....	.....
E. rhod.AF009856	....G.....	.....	.....	.....	.....	....G....
E. rhododendri a	.....	.....	.....	.....	.....	....G....
E. rhododendri b	.....	.....	.....	.....	.....	....G....
E. yoshinagai	.....	.....	.....	.....	.....	....GT...
E. oxycocci	.....	.....	.....	.....	.....	.....
E. rostrupii	.....	.....	.....	.....	.....	....GT...
E. arescens	.....	.....	.....	.....	.....	....GT...
E. pachysporum	.....	.....	.....	.....	.....	....GT...
E. bisporum	.....	.....	.....	.....A.....	.....	....GT...
E. pieridis-oval.	.....	.....	.....	.....A.....	.....	....GT...
E. vaccinii	.....	.....	.....	.....	.....	.....
E. karstenii	.....	.....	.....	.....	.....	.....
E. sundstroemii	....G.....	.....	....G.....	.....	.....	....C.G....
E. myrtilli	.....	.....	.....	.....	.....	....G.....
E. gracile	.....	.....	.....	.....A.....	.....	....G....
E. reticulatum	.....	.....	.....	.....	.....	....G....
E. symploci-jap.	.....	.....	.....	....C.A.....	....A.....	....CGT...
Arcticomycetes	.....	.....	.....	.....	.....	....C.G....
Muribasidiospora	.....	.....	.....	.....	.....	....G.AGGG..
Graphiola phoen.	.....	.....	.....	....G.....	.....	....C.-G....
Graphiola cylind.	.....	.....	.....	....C.G.....	.....	....C.-G....
Kordyana	.....	.....	.....	....GC.C.....	.....	....G.G.G...
Dicellomyces	.....	.....	.....	....GC.C.....	....T...T..	....G.AGTG..
Clinoconidium	.....	.....	.....	....C.G.....	G..T.....	....GCGGTT.G
Laurobasidium	.....	.....	.....	....C.G.....	G..T.....	....GCCGTT.G
Eballistra	.....	.....	....G.....	....GC.....	....M..CTA..	....TG..TG.A
Tilletiopsis min.	.....	.....	....G.....	....GC.....	....CTA.....	....CTG..G.G
Georgefischeria	.....	.....	....G.....	....GC.....	....T.A.....	....CTGG...A
Tilletiopsis ful.	.....	.....	....G.....	....GC.....	....C.A.....	....CTGGC.G.G
Tilletiopsis fla.	.....	.....	....G.....	....GC.....	....C.A.....	....CTGGC.G.G
Tilletiaria	.....	.....	....G.....	....GC.....	....CTA.....	....CTGGC.G.G
Jamesdicksonia	.....	.....	....G.....	....GC.G.....	....C.A.....	....CCAG..GAG
Rhamphospora	.....	.....	....G.....	....GC.....	....T.A.....	....CGG....G
Doassansia	.....	.....	....G.....	....GC.....	....TTA.....	....C.C.C.G.G
Doassinga	.....	.....	....G.....	....GC.....	....T.A.....	....C.C.C.G.G
Nannfeldtiomyces	.....	.....	....G.....	....GC.....	....TTA.....	....C.C.C.G.G
Erratomyces	.....	.....	.....	....GC.....	G..T..CTA..	....C.G-...G
Conidiosporomyces	.....	.....	.....	....GC.....	G..T..CTA..	....C.CG-...G
Tilletia	.....	.....	.....	....GC.....	G..T...A...	....C.G-...G
Ingoldiomyces	.....	.....	.....	....GC.....	G..T..C.A..	....C.G-...G
Malassezia fur.	.....-.....	.....	....G.....	....GC.....	....C.A.....	....CCGC...G
Malassezia sym.	.....-.....	.....	....G.....	....GC.....	....C.A.....	....CTGCG.-G
Tilletiopsis alb.	.....	.....	....G.....	....GC.....	....A.....	....CT.GCT..G
Microstroma alb.	.....	.....	....G.....	....GC.....	....T...A...	....CC.GCTG.A
Rhodotorula	.....	.....	....G.....	....GC.....	....T...A...	....CC.GCTG.A
Microstroma jug.	.....	.....	....G.....	....GC.....	....T...A...	....CC.A.T..G
Sympodiomyces	.....	.....	....G.....	....GC.A.....	....T...A...	....CC.A.TG.G
Volvocisporium	.....	.....	....G.....	....GC.....	....T.....	....CT.GC.G.G
Tilletiopsis pal.	.....	.....	....G.....	....GC.....	....A.....	....C-.GCTGAG
Entyloma polysp.	.....	.....	.....	....C.G..A.....	....T..T.A...	....CT.GC.T.G
Entyloma calend.	.....	.....	.....	....C.G..A.....	....T..T.A...	....CT.GC.T.G
Entyloma ficariae	.....	.....	.....	....C.G.....	....T..T.A...	....CT.GC.T.G
PB 2857e	.....	.....	.....	....C.G.....	....T..T.A...	....CT.GC.T.G
Tilletiopsis was.	.....	.....	.....	....GC.....	....T..TTA...	....CT.GCTG.G
PB 393	.....	.....	.....	....GC.....	....T..TTA...	....CT.GCTG.G
Sporisorium	.....	.....	....C.....	....GG.AG..	G.....GA...	....CG.C.TG.G
Ustilago	.....	.....	....C.....	....GG.AG..	G.....GA...	....CG.C.TG.G
RBF 726	.....	.....	....C.....	....GG.AG..	G.....GA...	....CG.C.TG.G
Pseudozyma	.....	.....	....C.....	....GG.AG..	G.....GA...	....CGGCCTG.G
Doassansioopsis	.....-.....	.....	....C.GG.....	....GG.AG.G	....A.....	....CTGC.ATTA
Entorrhiza caspa.	..G...A...	.....	....CT.....	....GAAA..	GAC...T.T.	....ACTAGCT.A.
Entorrhiza asch.	..G...A...	.....	....CT.....	....GAAA..	GAC...T.T.	....ACTGGCT.A.

	361	**	*****	****		*****	**
E. japonicum	ATTCAGCCTT	-GCTTTT---	GCTTGGTGTA	TTTGCTGTC-	GTACAGGCCA	ACATCAGTTT	
E. shiraianum	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
E. rhod.AF009856	.....	.....	.....	.....A	.....TT	.....	.....
E. rhododendri a	.....	.....	.....	.....A	T.....T	.....	.....
E. rhododendri b	.....	.....	.....	.....A	.....T	.....	.....
E. yoshinagai	.....	.....	.....	.....A.A	T.....	.....G	.....
E. oxycocci	.....	.....T.T	.....	.....TT	T.....	.....	.....
E. rostrupii	.....	.....	.....	.....A.T	.....	.....	.....
E. arescens	.....	.....	.....	.....A.T	T.....	.....	.....
E. pachysporum	.....	.....	.....	.....A.T	T.....	.....	.....
E. bisporum	.....	.....	.....	.....A.T	T.....	.....	.....
E. pieridis-oval.	.....	.....	.....	.....A.T	T.....	.....	.....
E. vaccinii	.....	.....	.....-	.....T	.....	.....	.....
E. karstenii	.....	.....	.....-	.....T	.....	.....	.....
E. sundstroemii	.....	T.....	.....	.....C.T	.C.....	.....	.....
E. myrtilli	.....	.....	.....	.....T	.....	.....	.....
E. gracile	.....	.....	.....T	.....	.....	.....	.....
E. reticulatum	.....	.....T.T	.....	.....A	.....	.....	.....
E. symploci-jap.	.....	.....C.....	.....T	.....CA	.....	.....	.....
Arcticomyces	.....	.....	.....	.....A	.....	.....	.....
Muribasidiospora	.....	.T.....	A.....	.....CTCT	.....	.....	.....
Graphiola phoen.	.C.....G	.....G...	.....	.....T	T.G.....	.....GA...	.....
Graphiola cylind.	.....G	.....CG...	.....	..AT...T	T.G.....	.....GA...	.....
Kordyana	.C.....--	-----	TTAC..C..T	..A.C..T	T...TA...	G...GA...	.....
Dicellomyces	GC.....--	-----	..AA..C..T	..CAT..CT	AC.....	.....G...G	.....
Clinoconidium	.....T..	.TT.....	AAAAA.....	..C.AT..	.....	G...G...	.....
Laurobasidium	.....T..	.TT.....	--AAA.....	..C.G.CG.	.....	G...G...	.....
Eballistra	.....A..	.....	.....	C..T.CT.G	TA.....	G...G...	.....
Tilletiopsis min.	.....	.....T	.....	..C.C.G..	..G.....	G...G...	.....
Georgefischeria	.....	..TA...C.T	A.....C..	C..TT..G..	ACG...T..	G...G...	.....
Tilletiopsis ful.	.....G.	.....	..A.....	..C.C.GTC	TCG.....	G...G...	.....
Tilletiopsis fla.	.....A.	.....	..A.....	..C.C.GTG	T.G.....	G...G...	.....
Tilletiaria	.....A.	.....	..C.....	..C.C.GTG	T.G...T..	G...G...	.....
Jamesdicksonia	.....	.....	..C.....	C..TTC.AT	TGG.....	G...G...	.....
Rhamphospora	T.....	.....C...	.....	..AC...G-	ACG.....	G...G...	.....
Doassansia	T.....	.....	.....	..AC.C.G-	T.G...T..	G...G...	.....
Doassinga	T.....	.....	.....	..AC.C.G-	T.G.....	G...G...	.....
Nannfeldtiomyces	T.....	.....C...	.....	..AC.C.G-	T.G...T..	G...G...	.....
Erratomyces	.....T..	.T.....	.AGGA.....	..T.....-	A.G.....	G...G...	.....
Conidiosporomyces	.....	.T.....	.GAG.....	C.....G.	T.G.....	G...GA...	.....
Tilletia	.....A...	.T...G.G	A...C..	.....T.	..G.....	G...G...	.....
Ingoldiomyces	.....	.T...GAG	.GGG...G.	.....T.	..G.....	G...G...	.....
Malassezia fur.	.C.....G	.....	.....	..C...GG.	TAG..A.T.	G...TG...	.....
Malassezia sym.	.C.....CG	...GA...	..C.....	..C.CAG..	-AG..A.T.	G...GGA...	.....
Tilletiopsis alb.	.C.....	.....	.....C	..C...GT.	.AG.....	G...G...	.....
Microstroma alb.	.....	.....T	.....	..T.CAGT.	.AG.....	G.....	.....
Rhodotorula	.....	.....T	.....	..T.C.GT.	.AG.....	G.....	.....
Microstroma jug.	.....	.....	.....	..C...GT.	AAG.....	G.....	.....
Sympodiomyces	.....	.....	.....	..C.C.GT.	.AG.....	G.....	.....
Volvocisporium	.....	.....C...	..AG.....	..C.C.GT.	ACG.....	G.....	.....
Tilletiopsis pal.	.C.....	..G.....	C.....	..CTCAGT.	TGG.....	G.....	.....
Entyloma polysp.	.C.....	.....	.....C.	..C.A.GT.	TAG...T..	C...G...	.....
Entyloma calend.	.C.....	.....	.....C.	..C.A.GT.	TAG...T..	G...G...	.....
Entyloma ficariae	.C.....	.....	.....C.	..C.A.GT.	ACG...T..	G...G...	.....
PB 2857e	.C.....	.....	.....C.	..C.A.GT.	ACG...T..	G...G...	.....
Tilletiopsis was.	.C.....	.....	.....C.	..C..AGT.	A.G...T..	G...G...	.....
PB 393	.C.....	.....	.....C.	..C.CAGT.	A.G...T..	G...G...	.....
Sporisorium	.....	.....T.C	.....T	..C.CAAG.	T.G.....	..G...G...	.....
Ustilago	.....	.....C...	..C.....T	..C.CAAG.	C.G.....	..G...G...	.....
RBF 726	.....	.....	.....C...T	..C.CAAG.	C.G.....	..G...G...	.....
Pseudozyma	.....	.....	.....T	..C.CAGA.	T.G.....	..G...G...	.....
Doassansioopsis	.....G.	AC...G..G	.T.A.....	..TAGTAG.	TGG.....	K...G...	.....
Entorrhiza caspa.	.A...A.T..	A...A...	.TA.....C.	C..AT.AGT.	TAGT.....	.....	.....
Entorrhiza asch.	.A.....	A.....	.TA.....C.	C..AT.AGT.	TAGT.....	.....	.....

E. japonicum	TGAGTGACGG	ATAAGGGTAG	AGAGAATGTG	GCACC---TT	CG--GG-TGT	GTT-ATAGCT
E. shiraianum	.....	.....	.....	.....	.....	.....
E. rhod.AF009856	.....	.....	.....	..T...C.	....A...	.....T.
E. rhododendri a	C.....	.....	.....	..T...C.	....A...	.....
E. rhododendri b	.....	.....	.....	..T...C.	....A...	.....
E. yoshinagai	.....	.....	.....	..T...	.....	.....
E. oxycocci	.....	.....	..A.....A	.....	T.....	.....
E. rostrupii	...AC.....	.....T	TTG.....	..T...C.	....A...	.....C
E. arescens	..A.....	.....T	TTG.....	.....C.	.....	.....C
E. pachysporum	..A.....	.....T	TA.....	..T...C.	....A...	.....
E. bisporum	..A.....	.....T	TTG.....	..T...C.	....A...	.....C
E. pieridis-oval.	..A.....	.....T	TTG.....	..T...	....A...	.....C
E. vaccinii	.....	.....	GAG.....	.....C.	.....	.....C
E. karstenii	.....	.....	A GAG.....	.....C.	.....	.....C
E. sundstroemii	.....	.....	T G.G.....	.....C.	.....	.....C
E. myrtilli	.....	.....	T G.G.....	.....C.	.....	.....C
E. gracile	..C.....	.....T	G.....	.....C.	.....	.....
E. reticulatum	..GT..T..	.....T	G.....	..T...C.	T...A...	.....
E. symploci-jap.	..GA..G...	.....T	G.G.....	.....C.	.....	.....C
Arcticomycetes	...C.....	..G.....T	G.G.....	.....C.	.....	.....C
Muribasidiospora	C.....	.....T	G.....A	..GT...C.	....C...	..T.....
Graphiola phoen.	..TG.CA...	.....	.....	..CT...CC	....A.G..	.....
Graphiola cylind.	..CG.CA...	.....T	..G.....	..CT...C	....A.G..	.....C
Kordyana	...CA...	.....GT	G.G...C...	.....-	.....	.....MC
Dicellomyces	..AG.G.GT..	..G..TA.GC.	GAG.....	.....C	.....C	.....C
Clinoconidium	..CT.G.C...	.....C.	GA...C..A	..TTT..C.	....AAA..	.....C
Laurobasidium	..CG.GAT...	.....GA	GAG...C..A	..TTT..C.	....AT...	.....C
Eballistra	CATCG.C...	.....	GAG...C..A	..T...CC.	....A...	..C...C
Tilletiopsis min.	C.GC..C...	.....	..AG.....A	.....C.	.....	.....C
Georgefischeria	..GT.ACT..	.....A	GAG...G..A	..T...T..	....G...A.	.....C
Tilletiopsis ful.	C.GCC.CT..	.....	GAG...G...	..G...C.	....C...	.....C
Tilletiopsis fla.	C.GC..CT..	.....C.	GAGA..G..A	.....C.	.....	.....C
Tilletiaria	..GC..CT..	.....	GAG.....	.....C.	.....	.....C
Jamesdicksonia	G.GCC.C...	..G....CGA	GAG...G...	.....C.	.....	.....C
Rhamphospora	..CC..C...	...T..G.	GAG.....	.....C.	.....	.....C
Doassansia	..CC..T...	.....G.	GAG...C..A	.....C.	.....	.....C
Doassinga	..CC..C...	.....C.	GAG...C..A	.....C.	.....	.....C
Nannfeldtiomyces	..CC..T...	...T...T.	GAG...C...	.....C.	.....	.....C
Erratomyces	..C..CT..	.....T	GAG.....	.....C.	.....	.....C
Conidiosporomyces	..TC..CT..	..G.....G.	CAG.....	.....C.	.....	.....C
Tilletia	..TC..CT..	...TA...	GAGA.....	..T.....	....A...	.....TC
Ingoldiomyces	..TC..CTA.	...TC...A	G.GA.....	.....C.	.....	.....AC
Malassezia fur.	G..TC.T...	..G...CA..	TCG.....	..G-....C.	....C...	.....C
Malassezia sym.	G..TC.C...	..G.....G.	GAG.....	.....C.	.....	.....-..C
Tilletiopsis alb.	..TCC.C...	.....	GAG...C...	.....C	.....	.....C
Microstroma alb.	..TC..T...	.....	GAG...C..A	..C...CC.	....GG..	.....C
Rhodotorula	..TC..T...	.....	GAG...C..A	..C...CC.	....GG..	.....C
Microstroma jug.	..TC..T...	.....	GAG.....	..-....C.	.....-	.....C
Sympodiomyces	C.GC..T...	.....TA	GAG.....	..-....C.	.....-	.....C
Volvocisporium	G.CC..C...	.....	GAG.....	..C...AC.	....T.GG..	.....-..C
Tilletiopsis pal.	..GC..TT..	.....	GAG.....	..T...C.	....A...	.....C
Entyloma polysp.	..C..CT..	.....GA	GAG.....	.....	.....	.....C
Entyloma calend.	..C..CT..	.....GA	GAG.....	.....	.....	.....C
Entyloma ficariae	..C..CT..	.....GA	GAG.....	.....C.	.....	.....C
PB 2857e	..C..CT..	.....GA	GAG.....	.....C.	.....	.....C
Tilletiopsis was.	..TC..CT..	.....G.	GAG...C...	.....C.	.....	.....C
PB 393	..TC..CT..	.....A	..AG...C...	.....C.	.....	.....C
Sporisorium	..G.CACT..	..G.....G.	GAG...C...	.....TC.	....G...	.....C
Ustilago	..G.CACT..	..G.....	GAG...C...	..-...TC.	....G...	.....C
RBF 726	..G.CACT..	..G.....	GAG...C...	.....TC.	....G...	.....C
Pseudozyma	..G.CACT..	..G.....	GAG...C...	.....CC.	....G...	.....C
Doassansiosis	GTGCC.CT..	...TA...TT	GAG.....	..TTATGC.	..GTATAA.	.....C
Entorrhiza caspa.	..TTT.ATTA.	...TA...A	CAG.....A	..TT...-	T...-TAA.	....A...C
Entorrhiza asch.	..CTT.ATTA.	...T...T.	TAG.....A	..TT...-	T...-TAA.	.....C



<i>E. japonicum</i>	CTTTACT-GG	ATACGTCGTT	T-GGGACTGA	GGAACGCAGC	GCGCC
<i>E. shiraianum</i>	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. rhod.AF009856</i>	..W.....	.....CY.	....N.G...	..C..N....	N.T..
<i>E. rhododendri a</i>	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. rhododendri b</i>	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. yoshinagai</i>	.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. oxycocci</i>	T.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. rostrupii</i>	T.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. arescens</i>	T.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. pachysporum</i>	T.....	.....	.....	.....	T....
<i>E. bisporum</i>	T.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. pieridis-oval.</i>	T.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. vaccinii</i>	TC.....	.....	.....	...A.....	.....
<i>E. karstenii</i>	T.C.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. sundstroemii</i>	..A.....	.....	.....	C.....	.....
<i>E. myrtilli</i>	..A.....	.....	.....	.....	.....
<i>E. gracile</i>	..A.....	.....A.	.....	.....	.....
<i>E. reticulatum</i>	..A.....	....A.T.AC	.....	.....	.....
<i>E. symploci-jap.</i>	..G....A.	.....C	.....	.....	.....
<i>Arcticomyces</i>	.CG.....	.....T.C.	.....	.....	.....
<i>Muribasidiospora</i>	..A.....	.....	.....	.....	.....
<i>Graphiola phoen.</i>	..C.....	.....T.CC	G.....TC..	.....	.TC..
<i>Graphiola cylind.</i>	..G.....	.....T.C.	G.....TC..	..T.....	..C..
<i>Kordyana</i>	T.AC.....	.....C.	.....TC..	.....	T..A..
<i>Dicellomyces</i>	TC.GC.C...	....A.CCC	C.AC...C..	..TCA....	.TT.G
<i>Clinoconidium</i>	TC..G...T.	.....G.T.G	G.....C..	..C.T....	.....
<i>Laurobasidium</i>	TC..T..T..	.....G.C.G	G..A...C..	..C.T....	.....
<i>Eballistra</i>	TC..G.....	.....G.TCG	GC.A...C..	.....	T.....
<i>Tilletiopsis min.</i>	T.....	.....GT.GC	.....C..	.....	T A...
<i>Georgefischeria</i>	TC.....	....AG.AGC	.....C..	.....	T .T...
<i>Tilletiopsis ful.</i>	TCC.....	....AG..GC	G.....C..	.....	T.....
<i>Tilletiopsis fla.</i>	TC..G.....	....AG..GC	.....C..	.....	T.....
<i>Tilletiaria</i>	TCC.G.....	....AG..GC	.....C..	.....	T.....
<i>Jamesdicksonia</i>	TC..G.....	.....G..GC	C.T...C..	.....	T .T...
<i>Rhamphospora</i>	TCCC.....	.....G..GG	.....C..	.....	A....
<i>Doassansia</i>	T.C.T....	.....AT.G.	.....C..	..T.....	.....
<i>Doassinga</i>	TCC.T....	.....GT.GG	C.....C..	..T.....	.....
<i>Nannfeldtiomyces</i>	TCC.T....	.....G..GG	C.....C..	..T.....	.....
<i>Erratomyces</i>	T.A.....	....AG..G.	.....	.....	T.....
<i>Conidiosporomyces</i>	TGC.....	..G.AGT.GA	.....TC..	..CT...T	.T...
<i>Tilletia</i>	TCG..T....	....AGT.GA	.....C..	..C...T	.TT..
<i>Ingoldiomyces</i>	TC.....	....AGT.GA	.....C..	..C...T	.T...
<i>Malassezia fur.</i>	T.C..T....	.....A..A.	C.TA...CA.	.....	..-
<i>Malassezia sym.</i>	TCC.....	.....G..A.	..T...TCC.	.....	T .T...
<i>Tilletiopsis alb.</i>	TCC.....	.....G..GA	.....C..	.....	T .T...
<i>Microstroma alb.</i>	TC.....	.....G..GA	.....	..C...T	.T...
<i>Rhodotorula</i>	TC.....	.....G..GA	.....	..C...T	.T...
<i>Microstroma jug.</i>	TC.....	.....G..GA	.....	..C...T	.....
<i>Symptodiomyces</i>	T..A.....	.....G..GC	.....	.....	.T...
<i>Volvocisporium</i>	TCC.....	.....G..GG	C.C.....	..T...T	.....
<i>Tilletiopsis pal.</i>	TC.....	....AA..GC	.....	.....	T .T...
<i>Entyloma polysp.</i>	TC.....	..G.AG.AG.	.....C..	.....	.....
<i>Entyloma calend.</i>	T..C.....	..G.AG.AG.	.....C..	.....	.....
<i>Entyloma ficariae</i>	T..C.....	..G.AG.AG.	.....C..	.....	.....
<i>PB 2857e</i>	T..C.....	..G.AG.AG.	.....C..	.....	.....
<i>Tilletiopsis was.</i>	TCC.....	....AG..GA	C.....C..	.....	.....
<i>PB 393</i>	T.C.....	....AG..GA	C.....C..	.....	.....
<i>Sporisorium</i>	TCC.....	....AG..AC	C..A...C..	..CA....	.TA.T
<i>Ustilago</i>	TCC.....	....AG..AC	C..A...C..	.....	..TA.T
<i>RBF 726</i>	TCC.....	....AG..AC	C..A...C..	.....	..TA.T
<i>Pseudozyma</i>	TCC.....	....AG..AC	C..A...C..	..CA....	.TA.T
<i>Doassansiopsis</i>	TC.....	A G...AG..GC	G.T...C..	.....	..A..
<i>Entorrhiza caspa.</i>	TG.....	T...TAATAGA	G.....	..CT...T	.T..T
<i>Entorrhiza asch.</i>	TG.....	T...TAATAGA	G.....	..CT...T	.T..T

## Anhang XV

### Alignment von Sequenzen der 18S rDNA

Die drei in der vorliegenden Arbeit erstellten Sequenzen der 18S rDNA wurden in diesem Alignment mit 21 Sequenzen von Vertretern der Basidiomycota aus GENBANK homologisiert. Das Alignment entspricht, bezogen auf *Saccharomyces cerevisiae*, der 18S rDNA von Position 51 bis 1760.

Die hier erstellten Sequenzen sind mit den Stammmnummern gekennzeichnet und durch GROSSBUCHSTABEN hervorgehoben, für die GENBANK-Einträge (siehe Kapitel 2.3.4.3.3) sind die Artnamen angegeben. Gap = „-“.

Von der phylogenetischen Analyse wurden folgende nicht eindeutig homologisierbaren Alignmentpositionen ausgeschlossen: 23-26, 126-130, 141-145, 179-197, 452-460, 604-666, 676-711, 757+758, 801+802, 806+807, 1.035-1.048, 1.155-1.159, 1.350-1.369, 1.398-1.401, 1.485-1.491, 1.681-1.682, 1.704-1.706.

Schizoph.commune	atgcatgtct	aagtataaac	aagtttgtac	tgtgaaactg	cgaatggctc	attaaatcag	60
Agaricus bisporus	atgcatgtct	aagtataaac	aaatthgtac	tgtgaaactg	cgaatggctc	attaaatcag	
Boletus satanas	atgcatgtct	aagtataaac	aagtttgtac	tgtgaaactg	cgaatggctc	attaaatcag	
Russula compacta	atgcatgtct	aagtataaac	aagtttgtcc	tgtgaaactg	cgaatggctc	attaaatcag	
Hirneo.auricula	atgcatgtct	aagtataaac	aaatthatac	tgtgaaactg	cgaatggctc	attaaatcag	
Dacry.stillatus	atgcatgtct	aagtataaac	aa-ttt-atac	ggtgaaactg	cgaatggctc	attatatcag	
Tremella foliacea	atgcatgtct	aagtataaac	aaatthatac	tgtgaaactg	cgaatggctc	attaaatcag	
Ustilago maydis	atgcatgtct	aagtataaac	aaatthatac	tgtgaaactg	cgaatggctc	attaaatcag	
Ustilago hordei	atgcatgtct	aagtataaac	aaatthatac	tgtgaaactg	cgaatggctc	attaaatcag	
PB 4381	ATGCATGTCT	AAGTATAAGC	WA-TTATTAC	TGTGAAACTG	CGAATGGCTC	ATTAAATCAG	
PB 3275	ATGCATGTCT	AAGTATAAGC	AA-TTATTAC	TGTGAAACTG	CGAATGGCTC	ATTAAATCAG	
Gra.cylindrica	atgcatgtct	aagtataaac	aa-ttt-tac	tgtgaaactg	cgaatggctc	attaaatcag	
Gra.phoenicis	atgcatgtct	aagtataaac	aa-ttt-tac	tgtgaaactg	cgaatggctc	attaaatcag	
RBF 1008	ATGCATGTCT	AAGTATAAAC	AACCTTGTAC	TGTGAAACTG	CGAATGGCTC	ATTAAATCAG	
Tilletiopsis palles.	atgcatgtct	aagtataaac	aaatthgtac	tgtgaaactg	cgaatggctc	attaaatcag	
Tilletiopsis albes.	atgcatgtct	aagtataaac	aactthgtac	tgtgaaactg	cgaatggctc	attaaatcag	
Tilletia caries	atgcatgtct	aagtataaac	aactthatac	tgtgaaactg	cgaatggctc	attaaatcag	
Tilletiaria anomala	atgcatgtct	aagtataaac	aactthatac	tgtgaaactg	cgaatggctc	attaaatcag	
Tilletiopsis minor	atgcatgtct	aagtataaac	aactthatac	tgtgaaactg	cgaatggctc	attaaatcag	
Tilletiopsis flava	atgcatgtct	aagtataaac	aaatthatac	tgtgaaactg	cgaatggctc	attaaatcag	
Ery.hasegawianum	atgcatgtct	aagtataaac	aaatthatac	tgtgaaactg	cgaatggctc	attaaatcag	
Crona.ribicola	atgcatgtct	aagtataaac	aa-tt-atac	agtgaaactg	cgaatggctc	attaaatcag	
Rhodo.toruloides	atgcatgtct	aagtataaac	aa--taa-ac	agtgaaactg	cgaatggctc	attaaatcag	
Microb.violaceum	atgcatgtct	aagtataaac	aa--taa-ac	ggtgaaactg	cgaatggctc	attaaatcag	

Schizoph.commune	ttataattta	tttcatgata	ccttgctaca	tgataaactg	tgtaattct	agagctaata	120
Agaricus bisporus	ttatagttta	tttcatgata	ccttgctaca	tgataaactg	tgtaattct	agagctaata	
Boletus satanas	ttatagttta	tttcatgata	ccttgctaca	tgataaactg	tgtaattct	agagctaata	
Russula compacta	ttatagttta	tttcatgata	ccttgctaca	tgataaactg	tgtaattct	agagctaata	
Hirneo.auricula	ttatagttta	tttcatgata	ccttgctaca	tgataaactg	tgtaattct	agagctaata	
Dacry.stillatus	ttatagttta	tttcatgata	ccttgctaca	tgataaactg	tgtaattct	agagctaata	
Tremella foliacea	ttatagttta	tttcatgata	ccttgctaca	tgataaactg	tgtaattct	agagctaata	
Ustilago maydis	ttatagttta	tttcatgata	ccttgctaca	tgataaactg	tgtaattct	agagctaata	
Ustilago hordei	ttatagttta	tttcatgata	ccttgctaca	tgataaactg	tgtaattct	agagctaata	
PB 4381	TTATAGTTTA	TTTGTATGTA	CCTTACTACA	TGGATAACTG	TGGTAATTCT	AGAGCTAATA	
PB 3275	TTATAGTTTA	TTTGTATGTA	CCTTACTACA	TGGATAACTG	TGGTAATTCT	AGAGCTAATA	
Gra.cylindrica	ttatagttta	tttcatgata	ccttgctaca	tgataaactg	tgtaattct	agagctaata	
Gra.phoenicis	ttatagttta	tttcatgata	ccttgctaca	tgataaactg	tgtaattct	agagctaata	
RBF 1008	TTATAGTTTA	TTTGTATGTA	TCTTGCTACA	TGGATAACTG	TGGTAATTCT	AGAGCTAATA	
Tilletiopsis palles.	ttatagttta	tttcatgata	ccttgctaca	tgataaactg	tgtaattct	agagctaata	
Tilletiopsis albes.	ttatagttta	tttcatgata	ccttgctaca	tgataaactg	tgtaattct	agagctaata	
Tilletia caries	ttatagttta	tttcatgata	ccttgctaca	tgataaactg	tgtaattct	agagctaata	
Tilletiaria anomala	ttatagttta	tttcatgata	ccttgctaca	tgataaactg	tgtaattct	agagctaata	
Tilletiopsis minor	ttatagttta	tttcatgata	ccttgctaca	tgataaactg	tgtaattct	agagctaata	
Tilletiopsis flava	ttatagttta	tttcatgata	ccttgctaca	tgataaactg	tgtaattct	agagctaata	
Ery.hasegawianum	ttatagttta	tttcatgata	ccttgctaca	tgataaactg	tgtaattct	agagctaata	
Crona.ribicola	ttatagttta	tttcatgata	ccttgctaca	tgataaactg	tgtaattct	agagctaata	
Rhodo.toruloides	ttatagttta	tttcatgata	ccttgctaca	tgataaactg	tgtaattct	agagctaata	
Microb.violaceum	ttatagttta	tttcatgata	ccttgctaca	tgataaactg	tgtaattct	agagctaata	

Schizoph.commune	catgcaatc-	aagccccgac	ttc-tggaag	gggtgtattt	attagataaa	aaacc-aacg	180
Agaricus bisporus	catgcaatc-	aagccccgac	ttc-cggaag	gggtgtattt	attagataaa	aaacc-aacg	
Boletus satanas	catgcaatc-	aagccccgac	ttc-tggaag	gggtgtattt	attagataaa	aaacc-aacg	
Russula compacta	catgcaatc-	aagccccgac	ttc-tggaag	gggtgtattt	attagataaa	aaacc-aacg	
Hirneo.auricula	catgcaatc-	aagccccgac	ttc-tggaag	gggtgtattt	attagataaa	aaacc-aacg	
Dacry.stillatus	catgcaatc-	aagccccgac	ttc-tggaag	gggtgtattt	attagataaa	aaacc-aacg	
Tremella foliacea	catgcaatc-	aagccccgac	ttc-tggaag	gggtgtattt	attagataaa	aaacc-aacg	
Ustilago maydis	catgcaatc-	aagccccgac	ttc-tggaag	gggtgtattt	attagataaa	aaacc-aacg	
Ustilago hordei	catgcaatc-	aagccccgac	ttc-tggaag	gggtgtattt	attagataaa	aaacc-aacg	
PB 4381	CATGCTTAC-	AAGCCCCGAC	TTC-TGGAAG	GGGTGTATTT	ATTAGGTA-A	AAACC-AAC-	
PB 3275	CATGCTTAC-	AAGCCCCGAC	TTC-TGGAAG	GGGTGTATTT	ATTAGGTA-A	AAACC-AAC-	
Gra.cylindrica	catgcaatc-	aagccccgac	ttc-tggaag	gggtgtattt	attagataaa	aaacc-aacg	
Gra.phoenicis	catgcaatc-	aagccccgac	ttc-tggaag	gggtgtattt	attagataaa	aaacc-aacg	
RBF 1008	CATGCTTAA-	AAGCCCCGAC	TTC-TGGAAG	GGGTGTATTT	ATTAGGTA-A	AAACC-AAC-	
Tilletiopsis palles.	catgcaatc-	aagccccgac	ttc-tggaag	gggtgtattt	attagataaa	aaacc-aacg	
Tilletiopsis albes.	catgcaatc-	aagccccgac	ttc-tggaag	gggtgtattt	attagataaa	aaacc-aacg	
Tilletia caries	catgcaatc-	aagccccgac	ttc-tggaag	gggtgtattt	attagataaa	aaacc-aacg	
Tilletiaria anomala	catgcaatc-	aagccccgac	ttc-tggaag	gggtgtattt	attagataaa	aaacc-aacg	
Tilletiopsis minor	catgcaatc-	aagccccgac	ttc-tggaag	gggtgtattt	attagataaa	aaacc-aacg	
Tilletiopsis flava	catgcaatc-	aagccccgac	ttc-tggaag	gggtgtattt	attagataaa	aaacc-aacg	
Ery.hasegawianum	catgcaatc-	aagccccgac	ttc-tggaag	gggtgtattt	attagataaa	aaacc-aacg	
Crona.ribicola	catgcaatc-	aagccccgac	ttc-tggaag	gggtgtattt	attagataaa	aaacc-aacg	
Rhodo.toruloides	catgcaatc-	aagccccgac	ttc-tggaag	gggtgtattt	attagataaa	aaacc-aacg	
Microb.violaceum	catgcaatc-	aagccccgac	ttc-tggaag	gggtgtattt	attagataaa	aaacc-aacg	

Schizoph.commune	-cggctcgcc	gctcacttg-	gt-gattcat	aataacttct	cgaatcgcat	ggccttgccg	240
Agaricus bisporus	-cggttcgcc	gctcccttg-	gt-gattcat	aataacttct	cgaatcgcat	ggccttggtg	
Boletus satanas	-cggctcgcc	gctcgtttg-	gt-gattcat	aataactgct	cgaatcgcat	ggccttggtg	
Russula compacta	-cggctcgcc	gctccattg-	gt-gattcat	aataacttct	cgaatcgcat	ggccttgccg	
Hirneo.auricula	-cggttcgcc	gctcccttg-	gt-gattcat	aataacttct	cgaatcgcat	ggccttgccg	
Dacry.stillatus	-c-cttcgg-	gcttg-ccg-	gt-gattcat	aataactgct	cgaatcgcat	ggccttggtg	
Tremella foliacea	-ggtgcaagc	ccttc-ttg-	gt-gattcat	aataacttct	cgaatcgcat	ggccttggtg	
Ustilago maydis	-ctcctcgga	gtt----tg-	gt-gattcat	aataacttct	cgaatcgcat	ggccttggtg	
Ustilago hordei	-ctcctcgga	gtt----tg-	gc-gattcat	aataacttct	cgaatcgcat	ggccttggtg	
PB 4381	-CGCTTCGGC	G-TCCTTTG-	GT-GAATCAT	AATAACTTTT	CTAATCGCAT	GGCCTTGTGC	
PB 3275	-CGCTTCGGC	G-TCCTTTG-	GT-GAATCAT	AATAACTTTT	CTAATCGCAT	GGCCTTGTGC	
Gra.cylindrica	-cgcttcggc	g-tcctttg-	gt-gaatcat	aataacttct	ctaactcgcat	ggccttgccg	
Gra.phoenicis	-cgcttcggc	g-tcctttg-	gt-gaatcat	aataacttct	ctaactcgcat	ggccttgccg	
RBF 1008	-C-CTTCGG-	G-TCCCTTG-	GT-GAATCAT	AATAACTTCT	CGAATCGCAT	GGCCTTGGCG	
Tilletiopsis palles.	-c-cttcgg-	g-tcccttg-	gt-gaatcat	aataacttct	cgaatcacat	ggccttggtg	
Tilletiopsis albes.	-c-cttcgg-	ggtcccttg-	gt-gaatcat	aataacttct	cgaatcgcat	ggccttggtg	
Tilletia caries	-c-cttcgg-	g-tcccttg-	gt-gaatcat	aataactttt	ctaactcgcat	ggccttggtg	
Tilletiaria anomala	-a-cttcgg-	ggtcccttg-	gt-gaatcat	aataacttct	ctgatcgcat	ggcctagccg	
Tilletiopsis minor	-t-cttcgg-	ggtcccttg-	gt-gaatcat	gacattttct	cgaatcgcat	ggcctagtg	
Tilletiopsis flava	-c-cttcgg-	ggtcccttg-	gt-gaatcat	aataacttct	ctgatcgcat	ggcctagtg	
Ery.hasegawianum	gcgggcaacc	gtc---ttga	gttgaatcat	gataacttct	cgaatcgcat	ggccttgccg	
Crona.ribicola	gc-tttcgg-	gtcttcttg-	gt-gattcat	aataactttt	caaactcgat	agccttggtg	
Rhodo.toruloides	gc-cttcgg-	gtctccttg-	gt-gaatcat	gataactgct	cgaatcgcat	ggccttgccg	
Microb.violaceum	g--cttcgg-	-tctctttg-	gt-gaatcat	gataactgct	cgaatcgcat	ggccttgccg	

Schizoph.commune	cggcgatgct	tcattcaaat	atctgcccta	tcaactttcg	atggtaggat	agaggcctac	300
Agaricus bisporus	cggcgatgct	tcattcaaat	atctgcccta	tcaactttcg	atggtaggat	agaggcctac	
Boletus satanas	tggcgatgct	tcattcaaat	atctgcccta	tcaactttcg	atggtaggat	agaggcctac	
Russula compacta	cggcgatgct	tcattcaaat	atctgcccta	tcaactttcg	atggtaggat	agaggcctac	
Hirneo.auricula	cggcgatgct	tcattcaaat	atctgcccta	tcaactttcg	atggtaggat	agaggcctac	
Dacry.stillatus	cggcgatgct	tcattcaaat	atctgcccta	tcaactttcg	atggtaggat	agaggcctac	
Tremella foliacea	cggcgatgct	tcattcaaat	atctgcccta	tcaactttcg	atggtaggat	agaggcctac	
Ustilago maydis	tggcgatgct	tcattcaaat	atctgcccta	tcaactttcg	atggtaggat	agaggcctac	
Ustilago hordei	tggcgatgct	tcattcaaat	atctgcccta	tcaactttcg	atggtaggat	agaggcctac	
PB 4381	CGGCGATGCT	TCATTCAAAT	ATCTGCCCTA	TCAACTCT-G	ATGGTAGGAT	AGAGGCCTAC	
PB 3275	CGGCGATGCT	TCATTCAAAT	ATCTGCCCTA	TCAACTCT-G	ATGGTAGGAT	AGAGGCCTAC	
Gra.cylindrica	cggcgatgct	tcattcaaat	atctgcccta	tcaacttt-g	atggtaggat	agaggcctac	
Gra.phoenicis	cggcgatgct	tcattcaaat	atctgcccta	tcaacttt-g	atggtaggat	agaggcctac	
RBF 1008	CGGCGATGCT	TCATTCAAAT	ATCTGCCCTA	TCAACTGTG	ATGGTAGGAT	AGAGGCCTAC	
Tilletiopsis palles.	cggtgatgct	tcattcaaat	atctgcccta	tcaactttcg	atggtaggat	agaggcctac	
Tilletiopsis albes.	cggcgatgct	tcattcaaat	atctgcccta	tcaactttcg	atggtaggat	agaggcctac	
Tilletia caries	cggcgatgct	tcattcaaat	atctgcccta	tcaactttcg	atggtaggat	agaggcctac	
Tilletiaria anomala	cggcgacgct	tcattcaaat	atctgcccta	tcaactttcg	atggtaggat	agaggcctac	
Tilletiopsis minor	cggcgatgct	tcattcaaat	atctgcccta	tcaactttcg	atggtaggat	agaggcctac	
Tilletiopsis flava	cggcgacgct	tcattcaaat	atctgcccta	tcaactttcg	atggtaggat	agaggcctac	
Ery.hasegawianum	cggcgatgct	tcattcaaat	atctgcccta	tcaactttcg	atggtaggat	agaggcctac	
Crona.ribicola	tgacgatgct	tcattcaaat	atctgcccta	tcaactttcg	atggtaggat	agaggcctac	
Rhodo.toruloides	cggcgatgct	tcattcgat	atctgcccta	tcaactttcg	atggtaggat	agaggcctac	
Microb.violaceum	cggcgatgct	tcattcaaat	atctgcccta	tcaactttcg	atggtaggat	agaggcctac	

Schizoph.commune	catggtttca	acgggtaacg	gggaataaag	gttcgattcc	ggagaggg-a	gcctgagaaa	360
Agaricus bisporus	catggtttca	acgggtaacg	gggaataaag	gttcgattcc	ggagaggg-a	gcctgagaaa	
Boletus satanas	catggtttca	acgggtaacg	gggaataaag	gttcgattcc	ggagaggg-a	gcctgagaaa	
Russula compacta	catggttttg	ncgg-taacg	gggaataaag	gttcgattcc	ggagaggg-a	gcctgagana	
Hirneo.auricula	catggtttca	acgggtaacg	gggaataaag	gttcgattcc	ggagaggg-a	gcctgagaaa	
Dacry.stillatus	catggtttca	acgggtaacg	gggaataaag	gttcgattcc	ggagaggg-a	gcctgagaaa	
Tremella foliacea	catggtatca	acgggtaacg	gggaataaag	gttcgattcc	ggagaggg-a	gcctgagaaa	
Ustilago maydis	catggttgca	acgggtaacg	gggaataaag	gttcgattcc	ggagaggg-a	gcctgagaaa	
Ustilago hordei	catggttgca	acgggtaacg	gggaataaag	gttcgattcc	ggagaggg-a	gcctgagaaa	
PB 4381	CATGGTTGCA	ACGGGTAACG	GGGAATAAAG	GTTCGATTCC	GGAGAGGG-A	GCCTGAGAAA	
PB 3275	CATGGTTGCA	ACGGGTAACG	GGGAATAAAG	GTTCGATTCC	GGAGAGGG-A	GCCTGAGAAA	
Gra.cylindrica	catggttgca	acgggtaacg	gggaataaag	gttcgattcc	ggagaggg-a	gcctgagaaa	
Gra.phoenicis	catggttgca	acgggtaacg	gggaataaag	gttcgattcc	ggagaggg-a	gcctgagaaa	
RBF 1008	CATGGTTGCA	ACGGGTAACG	GGGAATAAAG	GTTCGATTCC	GGAGAGGG-A	GCCTGAGAAA	
Tilletiopsis palles.	catggttgca	acgggtaacg	gggaataaag	gttcgattcc	ggagaggg-a	gcctgagaaa	
Tilletiopsis albes.	catggttgca	acgggtaacg	gggaataaag	gttcgattcc	ggagaggg-a	gcctgagaaa	
Tilletia caries	catggttgca	acgggtaacg	gggaataaag	gttcgattcc	ggagaggg-a	gcctgagaaa	
Tilletiaria anomala	catggttgca	acgggtaacg	gggaataaag	gttcgattcc	ggagaggg-a	gcctgagaaa	
Tilletiopsis minor	catggttgca	acgggtaacg	gggaataaag	gttcgattcc	ggagaggg-a	gcctgagaaa	
Tilletiopsis flava	catggttgca	acgggtaacg	gggaataaag	gttcgattcc	ggagaggg-a	gcctgagaaa	
Ery.hasegawianum	catggtgatg	acgggtaacg	gggaataaag	gttcgattcc	ggagagag-g	gcctgagaaa	
Crona.ribicola	catggtgatg	acgggtaacg	gggaataaag	gttcgattcc	ggagagag-g	gcctgagaaa	
Rhodo.toruloides	catggtgatg	acgggtaacg	gggaataaag	gttcgattcc	ggagagag-g	gcctgagaaa	
Microb.violaceum	catggtgatg	acgggtaacg	gggaataaag	gttcgattcc	ggagagag-g	gcctgagaaa	

Schizoph.commune	cggctaccac	atccaagga-	aggcagcagg	cgcgcaaatt	acccaatccc	gacac---gg	420
Agaricus bisporus	cggctaccac	atccaagga-	aggcagcagg	cgcgcaaatt	acccaatccc	gacac---gg	
Boletus satanas	cggctaccac	atccaagga-	aggcagcagg	cgcgcaaatt	acccaatccc	gattc---gg	
Russula compacta	cggctaccac	atccacgga-	aggcagnagg	cgcgcaaatt	acccaatccc	gacac---gg	
Hirneo.auricula	cggctaccac	atccaagga-	aggcagcagg	cgcgcaaatt	acccaatccc	gacac---g-	
Dacry.stillatus	cggctaccac	atccaagga-	aggcagcagg	cgcgcaaatt	acccaatccc	gacac---gg	
Tremella foliacea	cggctaccac	atccaagga-	aggcagcagg	cgcgcaaatt	acccaatccc	gacac---gg	
Ustilago maydis	cggctaccac	atccaagga-	aggcagcagg	cgcgcaaatt	acccaatccc	gacac---gg	
Ustilago hordei	cggctaccac	atccaagga-	aggcagcagg	cgcgcaaatt	acccaatccc	gacac---gg	
PB 4381	CGGCTACCAC	ATCCAAGGA-	AGGCNGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC	GACAC---GG	
PB 3275	CGGCTACCAC	ATCCAAGGA-	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC	GACAC---GG	
Gra.cylindrica	cggctaccac	atccaagga-	aggcagcagg	cgcgcaaatt	acccaatccc	gacac---gg	
Gra.phoenicis	cggctaccac	atccaagga-	aggcagcagg	cgcgcaaatt	acccaatccc	gacac---gg	
RBF 1008	CGGCTACCAC	ATCCAAGGA-	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC	GACAC---GG	
Tilletiopsis palles.	cggctaccac	atccaagga-	aggcagcagg	cgcgcaaatt	acccaatccc	gacac---gg	
Tilletiopsis albes.	cggctaccac	atccaagga-	aggcagcagg	cgcgcaaatt	acccaatccc	gacac---gg	
Tilletia caries	cggctaccac	atccaagga-	aggcagcagg	cgcgcaaatt	acccaatccc	gacac---gg	
Tilletiaria anomala	cggctaccac	atccaagga-	aggcagcagg	cgcgcaaatt	acccaatc-c	gacac---gg	
Tilletiopsis minor	cggctaccac	atccaagga-	aggcagcagg	cgcgcaaatt	acccaatccc	gacac---gg	
Tilletiopsis flava	cggctaccac	atccaagga-	aggcagcagg	cgcgcaaatt	acccaatccc	gacac---gg	
Ery.hasegawianum	cggccctcag	tcctaaggg-	acgcagcagg	cgcgcaaatt	atcccatccc	gacac---gg	
Crona.ribicola	cggccctcaa	atctaaggat	-tgcagcagg	cgcgcaaatt	acccaatccc	aacac---gg	
Rhodo.toruloides	cggccctcag	gtctaaggac	acgcagcagg	cgcgcaaatt	atcccctggc	aacactttgc	
Microb.violaceum	cggccctcag	gtctaaggac	acgcagcagg	cgcgcaaatt	atcccctggc	aacactttgc	

Schizoph.commune	ggaggtagt	acaataaata	acaatatagg	gctctttcgg	gtctataat	tggaatgagt	480
Agaricus bisporus	ggaggtagt	acaataaata	acaatatagg	gctctttcgg	gtctataat	tggaatgagt	
Boletus satanas	ggaggtagt	acaataaata	acaatatagg	gctcttttgg	gtctataat	tggaatgagt	
Russula compacta	ggaggtagt	acaataaata	acaatatagg	gcccttttgg	gtctataat	tggaatgagt	
Hirneo.auricula	ggaggtagt	acaataaata	acaatatagg	gctcttttgg	gtctataat	tggaatgagt	
Dacry.stillatus	ggaggtagt	acaataaata	acaatacagg	gctcttacgg	gtcttgaat	tggaatgagt	
Tremella foliacea	ggaggtagt	acaataaata	acaatatagg	gctctattgg	gtctataat	tggaatgagt	
Ustilago maydis	ggaggtagt	acaataaata	acaatgcagg	gcccttttgg	gtcttgaat	tggaatgagt	
Ustilago hordei	ggaggtagt	acaataaata	acaatgcagg	gcccttttgg	gtcttgaat	tggaatgagt	
PB 4381	GGAGGTAGTG	ACAATAAATA	ACAATATAGG	GCTTTCATAG	GTCTTATAAT	TGGAATGAGT	
PB 3275	GGAGGTAGTG	ACAATAAATA	ACAATATAGG	GCTTTCATAG	GTCTTATAAT	TGGAATGAGT	
Gra.cylindrica	ggaggtagt	acaataaata	acaatatagg	gccttta-ag	gtctataat	tggaatgagt	
Gra.phoenicis	ggaggtagt	acaataaata	acaatatagg	gccttta-ag	gtctataat	tggaatgagt	
RBF 1008	GGAGGTAGTG	ACAATAAATA	ACAATATAGG	GCTTTCATAG	GTCTTATAAT	TGGAATGAGT	
Tilletiopsis palles.	ggaggtagt	acaataaata	acaataaata	gcttt-atag	gtctataat	tggaatgagt	
Tilletiopsis albes.	ggaggtagt	acaataaata	acaatatagg	gtctt-acag	gcctataat	tggaatgagt	
Tilletia caries	ggaggtagt	acaataaata	acaatatagg	gctttta-aa	gtctataat	tggaatgagt	
Tilletiaria anomala	ggaggtagt	acaataaata	acaatatagg	gcc-t-acag	gtctataat	tggaatgagt	
Tilletiopsis minor	ggaggtagt	acaataaata	acaatatagg	gcttt--cag	gtctataat	tggaatgagt	
Tilletiopsis flava	ggaggtagt	acaataaata	acaatatagg	gccttt-cag	gtctataat	tggaatgagt	
Ery.hasegawianum	ggaggtagt	acaataaata	acaatatagg	gctcttttgg	gtctataat	tggaatgagt	
Crona.ribicola	ggaggtagt	acaataaata	acaatgatg	gctctttagg	gtcttacaat	tggaatgagt	
Rhodo.toruloides	cgagatagt	acaataaata	acaatgcagg	gctcttacgg	gtcttgaat	tggaatgagt	
Microb.violaceum	cgagatagt	acaataaata	acaatgcagg	gctcttacgg	gtcttgaat	tggaatgagt	

Schizoph.commune	acaatttaaa	tccttaacg	aggatcaatt	ggagggcaag	tctggtgcca	gcagccgagg	540
Agaricus bisporus	acaatttaaa	tccttaacg	aggaacaatt	ggagggcaag	tctggtgcca	gcagccgagg	
Boletus satanas	acaatttaaa	tctcttaacg	aggaacaatt	ggagggcaag	tctggtgcca	gcagccgagg	
Russula compacta	acaatttaaa	tccttaacg	aggaacaatt	ggagggcaag	tctggtgcca	gcagccgagg	
Hirneo.auricula	acaatttaaa	tccttaacg	aggaacaatt	ggagggcaag	tctggtgcca	gcagccgagg	
Dacry.stillatus	acaatttaaa	tccttaacg	aggaacaatt	ggagggcaag	tctggtgcca	gcagccgagg	
Tremella foliacea	acaatttaaa	tccttaacg	aggaacaatt	ggagggcaag	tctggtgcca	gcagccgagg	
Ustilago maydis	acaatttaaa	tccttaacg	aggaacgatt	ggagggcaag	tctggtgcca	gcagccgagg	
Ustilago hordei	acaatttaaa	tccttaacg	aggaacgatt	ggagggcaag	tctggtgcca	gcagccgagg	
PB 4381	ACAATTTAAA	TCCCTTAACG	AGGAACAATT	GGAGGGCAAG	TC'TGGTGCCA	GCAGCCGCGG	
PB 3275	ACAATTTAAA	TCCCTTAACG	AGGAACAATT	GGAGGGCAAG	TC'TGGTGCCA	GCAGCCGCGG	
Gra.cylindrica	acaatttaaa	tccttaacg	aggaacaatt	ggagggcaag	tctggtgcca	gcagccgagg	
Gra.phoenicis	acaatttaaa	tccttaacg	aggaacaatt	ggagggcaag	tctggtgcca	gcagccgagg	
RBF 1008	ACAATTTAAA	TCCCTTAACG	AGGAACAATT	GGAGGGCAAG	TC'TGGTGCCA	GCAGCCGCGG	
Tilletiopsis palles.	acaatttaaa	tccttaacg	aggaacaatt	ggagggcaag	tctggtgcca	gcagccgagg	
Tilletiopsis albes.	acaatttaaa	tccttaacg	aggaacaatt	ggagggcaag	tctggtgcca	gcagccgagg	
Tilletia caries	acaatttaaa	tccttaacg	aggaacaatt	ggagggcaag	tctggtgcca	gcagccgagg	
Tilletiaria anomala	acaatttaaa	tccttaacg	aggaacaatt	ggagggcaag	tctggtgcca	gcagccgagg	
Tilletiopsis minor	acaatttaaa	tccttaacg	aggaacaatt	ggagggcaag	tctggtgcca	gcagccgagg	
Tilletiopsis flava	acaatttaaa	tccttaacg	agga-caatt	ggagggcaag	tctggtgcca	gcagccgagg	
Ery.hasegawianum	acaatttaaa	tctcttaacg	aggatcaatt	ggagggcaag	tctggtgcca	gcagccgagg	
Crona.ribicola	acaatttaaa	tctcttaacg	aggatcaatt	ggagggcaag	tctggtgcca	gcagccgagg	
Rhodo.toruloides	acaatttaaa	tccttaacg	aggatcaatt	ggagggcaag	tctggtgcca	gcagccgagg	
Microb.violaceum	acaatttaaa	tccttaacg	aggatccatt	ggagggcaag	tctggtgcca	gcagccgagg	

Schizoph.commune	taattccagc	tccaatagcg	tatattaaag	ttgttgcagt	taaaaagctc	gtagttgaac	600
Agaricus bisporus	taattccagc	tccaatagcg	tatattaaag	ttgttgcagt	taaaaagccc	gtagttgaac	
Boletus satanas	taattccagc	tccaatagcg	tatattaaag	ttgttgcagt	taaaaagctc	gtagttgaac	
Russula compacta	taattccagc	tccaatagcg	tatattaaag	ttgttgcagt	taaaaagctc	gtagttgaac	
Hirneo.auricula	taattccagc	tccaatagcg	tatattaaag	ttgttgcagt	taaaaagctc	gtagttgaac	
Dacry.stillatus	taattccagc	tccaatagcg	tatattaaag	ttgttgcagt	taaaaagctc	gtagttgaac	
Tremella foliacea	taattccagc	tccaatagcg	tatattaaag	ttgttgcagt	taaaaagctc	gtagttgaac	
Ustilago maydis	taattccagc	tccaatagcg	tatattaaag	ttgttgcagt	taaaaagctc	gtagttgaac	
Ustilago hordei	taattccagc	tccaatagcg	tatattaaag	ttgttgcagt	taaaaagctc	gtagttgaac	
PB 4381	TAATTCCAGC	TCCAATAGCG	TATATTAAG	TTGTTGCAGT	TAAAAAGCTC	GTAGTTGAAC	
PB 3275	TAATTCCAGC	TCCAATAGCG	TATATTAAG	TTGTTGCAGT	TAAAAAGCTC	GTAGTTGAAC	
Gra.cylindrica	taattccagc	tccaatagcg	tatattaaag	ttgttgcagt	taaaaagctc	gtagttgaac	
Gra.phoenicis	taattccagc	tccaatagcg	tatattaaag	ttgttgcagt	taaaaagctc	gtagttgaac	
RBF 1008	TAATTCCAGC	TCCAATAGCG	TATATTAAG	TTGTTGCAGT	TAAAAAGCTC	GTAGTTGAAC	
Tilletiopsis palles.	taattccagc	ccaataacg	tatattaaag	ttgttgcagt	taaaaagctc	gtagttgaac	
Tilletiopsis albes.	taattccagc	tccaatagcg	tatattaaag	ttgttgcagt	taaaaagctc	gtagttgaac	
Tilletia caries	taattccagc	tccaatagcg	tatattaaag	ttgttgcagt	taaaaagctc	gtagttgaac	
Tilletiaria anomala	taattccagc	tccaatagcg	tatattaaag	ttgttgcagt	taaaaagctc	gtagttgaac	
Tilletiopsis minor	taattccagc	tccaatagcg	tatattaaag	ttgttgcagt	taaaaagctc	gtagttgaac	
Tilletiopsis flava	taattccagc	tccaatagcg	tatattaaag	ttgttgcagt	taaaaagctc	gtagttgaac	
Ery.hasegawianum	taattccagc	tccaatagcg	tatattaaag	ttgttgccgt	taaaaagctc	gtagtcgaac	
Crona.ribicola	taattccagc	tccaatagcg	tatattaaag	ttgttgacgt	taaaaagctc	gtagtcgaac	
Rhodo.toruloides	taattccagc	tccaatagcg	tatattaaag	ttgttgccgt	taaaaagctc	gtagtcgaac	
Microb.violaceum	taattccagc	tccaatagcg	tatattaaag	ttgttgccgt	taaaaagctc	gtagtcgaac	

Schizoph.commune	ttcaggcc-t	ggccggcg	t-ctgccta-	ac-ggtat--	gtactgtct-	ggccgggtct	660
Agaricus bisporus	ttcaggcc-t	ggtggggtg	t-ccgcta-	ac-ggcgt--	gtactgtct-	tgctgggtct	
Boletus satanas	tttgggcc-t	ggacggcg	t-ccgcgc-	aa-ggcgt-t	gtactgtct-	ggccggcct	
Russula compacta	ttcagacc-t	gaccggcg	t-ccgccta-	ac-ggtgt--	gtactgtct-	ggccggcct	
Hirneo.auricula	ttcagacc-t	ggccggcg	t-ccgc-tc-	ac-ggtgt--	gtactgtct-	ggctg-gcct	
Dacry.stillatus	ctcagcggt	gttc-tgtg	t-ccgcctc-	ac-ggcga--	gtactgttc	-acgccct	
Tremella foliacea	ttcaggc-tc	gatggatg	t-ctgcctt-	ac-ggtat--	gtactgtctc	g-tcgggtct	
Ustilago maydis	ttt-ggtctc	ggacgctgg	t-ctgccta-	at-tgcat--	gtacttga-c	ggtccgagac	
Ustilago hordei	ttt-ggtctc	ggacgctgg	t-ctgcctc-	at-tgcat--	gtacttgg-c	ggtccgagac	
PB 4381	TTCAGGCC-T	GGTCGTTCCG	T-CCGCCTC-	AC-GGCGTGT	TTACTGTATC	GACTGGGCC-	
PB 3275	TTCAGGCC-T	GGTCGTTCCG	T-CCGCCTC-	AC-GGCGTGT	CTACTGTATC	GACTGGGCC-	
Gra.cylindrica	ttcaggccct	gg-cgaccg	t-ccgcctc-	ac-ggcgt--	gaactgtgtc	ggttgggcc-	
Gra.phoenicis	ttcaggccct	gg-cgatcg	t-ccgcctc-	ac-ggcgt--	gaactgctgc	ggttgggcc-	
RBF 1008	TTCAGGCC-T	GGCCGGTCCG	T-CCGCCTC-	AC-AGCGT--	GTACTGTCT-	GGCCGGGCC-	
Tilletiopsis palles.	ttcggatc-t	ggccggcg	t-ccgtctt-	ac-ggcgt--	gtactgtca-	ggctggatc-	
Tilletiopsis albes.	ttcaggcc-t	ggccggcg	t-cc-ctta-	ac-aggca--	gtactgttt-	ggccgggcc-	
Tilletia caries	ttcagacc-t	ggccggcg	t-ccgcctc-	ac-ggcgt--	gtactgttt-	ggccgggtc-	
Tilletiaria anomala	ttcaggcc-t	ggccggcg	t-ccgcctc-	ac-ggcgt--	gtactgttt-	ggccgggcc-	
Tilletiopsis minor	ttcaggcc-t	ggctggtcg	-gct-cctc-	ac-ggcgt--	gtactgttt-	ggccgggcc-	
Tilletiopsis flava	ttcaggcc-t	ggccggcg	tgccgcttc-	ac-ggcgt--	gtactgtct-	ggctgggcc-	
Ery.hasegawianum	ttc-ggcctt	tgccggcg	t-ccgcctc-	ac-ggcgt--	gtactggagc	ggtggaagct	
Crona.ribicola	ttc-ggcctt	tgatgattg	t-ctgcctt-	tt-ggtgt--	gtactgttt	ggtggaagct	
Rhodo.toruloides	ttcgggct-c	tgag-cg	t-ccgcctc-	tt-ggtgt--	gtactgttt	ggtggaagct	
Microb.violaceum	ttcgggctc	tgtaagcg	t-ccgcctc-	tt-ggtgt--	gtactgtct	tgccgggact	

Schizoph.commune	tacc--tctt	ggtgaac-cg	gcgtgct-ct	ttactggg	c--gtcggg	-aaccaggac	720
Agaricus bisporus	tacc--tctt	ggtgagc-cg	gcgtggc-ct	tactgggtg	c--gtcggg	-aaccaggac	
Boletus satanas	ttcc--tctt	ggtgaac-cg	gtgtgcc-ct	tactgggtg	c--atcggg	-aaccaggac	
Russula compacta	tacc--tctt	ggtgagc-cg	gcagcc-ct	tactgggtg	t--gtcggg	-aaccaggac	
Hirneo.auricula	tacc--tctt	ggtgagc-cg	gcagcc-ct	tcgtgggtg	t--gtcggg	-aaccaggac	
Dacry.stillatus	tacc--tctt	ggtgagc-cc	gtatgcc--t	tcatt-ggtg	t--gcggag	-aaccaggac	
Tremella foliacea	tacc--tctt	ggtgagc-cc	gtatgcc-ct	tcactgggtg	t--gcgggtg	-aaccaggac	
Ustilago maydis	ttcct-tcct	ggtgaac--g	gc-cgcc-ct	-c---gggtg	---gtc-cgg	-aaccaggac	
Ustilago hordei	ttcct-tcct	ggtgaac--g	gc-cgcc-tt	-c---gggtg	---gtc-cgg	-aaccaggac	
PB 4381	TTCCCTTCTT	GGTGAGCTCT	GCATGCC-CT	TTATTGGGTG	TGTGGATGTC	TGGCCAGGAC	
PB 3275	TTCCCTTCTT	GGTGAGCTCT	GCATGCC-CT	TTATTGGGTG	TGTGGATGTC	TGGCCAGGAC	
Gra.cylindrica	ttcctttcct	ggtgagcctc	gtatgcc-gt	ttattcggtg	tgccaggtgc	tgccaggac	
Gra.phoenicis	ttcctttcct	ggtgagcctc	gtatgcc-gt	ttactcggtg	tgccaggtgc	tgccaggac	
RBF 1008	TTCCC-TCTA	GGTGATCC-G	GCATGCT-CT	TTACTGGGTG	T--GTCGGGG	-AACCTGGAC	
Tilletiopsis palles.	ttccc-tctt	ggtgagc-a	gcagtc-ct	ttactgggtg	t--ggtgta	-aaccaggac	
Tilletiopsis albes.	ttccc-tctt	ggtgatcc-g	gcagcc-ct	ttactgggtg	t--gtcggg	-aaccaggac	
Tilletia caries	ttctc-tctt	ggtgatcc-g	gcagct-ct	ttactgggtg	t--gtcggg	-aaccaggat	
Tilletiaria anomala	ttccc-ccct	ggtgatcc-g	gcagtc-ct	taattgggtg	t--gtcggg	-aaccaggac	
Tilletiopsis minor	ttccc-tcct	ggtgatcc-g	gcagcc-ct	tcattg-gtg	tggttcggg	-aaccaggac	
Tilletiopsis flava	ttccc-tcct	ggtgatcc-g	gcagctCct	ttactgggtg	t--gtc-ggg	-aaccaggac	
Ery.hasegawianum	tacc--tcgt	ggtgagct-g	ttatgcc-ct	ttactgggtg	t--ggcagg	-aacatgat	
Crona.ribicola	tacc--tctt	ggtgaact-t	caatgca-ct	ttactgggtg	t-tgaa-ggg	-aaccaggac	
Rhodo.toruloides	tacc--tcct	ggtgaaca-g	cgatgct-ct	tcactgggtg	t-cgtt-gca	-aaccaggac	
Microb.violaceum	tacc--tcct	ggtgaact-g	ccatgct-ct	ttactgggtg	t-ggta-gca	-aaccaggac	

Schizoph.commune	ttttaccttg	agaaaattag	agtgttcaaa	gcaggc-tta	cgcccgaata	cattagcatg	780
Agaricus bisporus	ttttaccttg	agaaaattag	agtgttcaaa	gcaggcc-ta	tgccctgaata	cattagcatg	
Boletus satanas	gtttaccttg	agaaaattag	agtgttcaaa	gcaggcgttt	cgcccgaata	cattagcatg	
Russula compacta	ctttaccttg	agaaaattag	agtgttcaaa	gcaggc-tta	cgcccgaata	cattagcatg	
Hirneo.auricula	ttttaccttg	agaaaattag	agtnttcaaa	gcaggcc-ta	tgccctgaata	cgttagcatg	
Dacry.stillatus	ttttaccttg	aaaaaattag	agtgttcaaa	gcaggc-ttg	cgcccgaata	cattagcatg	
Tremella foliacea	ttttactttg	aaaaaattag	agtgttcaaa	gcaggc-ata	tgcccgaata	cattagcatg	
Ustilago maydis	tattactttg	aaaaaattag	agtgttcaaa	gcaggccata	ggcccgaata	tattagcatg	
Ustilago hordei	cattactttg	aaaaaattag	agtgttcaaa	gcaggccata	ggcccgaata	tattagcatg	
PB 4381	TTTTACTTTG	AAAAAATTAG	AGTGTTCAAA	GCAGGCC-TA	TGCCCGAATA	TATTAGCATG	
PB 3275	TTTTACTTTG	AAAAAATTAG	AGTGTTCAAA	GCAGGCC-TA	TGCCCGAATA	TATTAGCATG	
Gra.cylindrica	ttttactttg	agaaaattag	agtgttcaaa	gcaggcc-ta	tgcccgaata	tattagcatg	
Gra.phoenicis	ttttactttg	aaaaaattag	agtgttcaaa	gcaggcc-ta	tgcccgaata	tattagcatg	
RBF 1008	TTTTACTTTG	AAAAAATTAG	AGTGTTCAAA	GCAGGCC-TA	TGCCCGAATA	TATTAGCATG	
Tilletiopsis palles.	ttttactttg	aaaaaattag	agtgttcaaa	gcaggcc-ta	tgcccgaata	tattagcatg	
Tilletiopsis albes.	ttttactttg	aaaaaattag	agtgttcaaa	gcaggcc-ta	tgcccgaata	tattagcatg	
Tilletia caries	ttttactttg	aaaaaattag	agtgttcaaa	gcaggcc-ta	tgcccgaata	tattagcatg	
Tilletiaria anomala	ttttactttg	aaaaaatcag	agtgttcaaa	gcaggcc-ta	cgcccgaata	cattagcatg	
Tilletiopsis minor	ttttaccttg	aaaaaattag	agtgttcaaa	gcaggcc-ta	cgcccgaata	tattagcatg	
Tilletiopsis flava	ttttactttg	aaaaaatcag	agtgttcaaa	gcaggc--ta	cgcccgaata	tattagcatg	
Ery.hasegawianum	ttttactttg	aaaaaattag	agtgttcaaa	gca--cgta	cgcccgaata	cattagcatg	
Crona.ribicola	ttttactttg	aaaaaattag	agtgttcaaa	gcaggc-ttt	tgccctgaata	cattagcatg	
Rhodo.toruloides	gtttactttg	aaaaaattag	agtgttcaaa	gcaggcc-tt	tgcccgaata	cattagcatg	
Microb.violaceum	gtttactttg	aaaaaattag	agtgttcaaa	gcaggcc-ta	cgcccgaata	cattagcatg	

Schizoph.commune	gaat-aataa	aa-taggaagc	t-gcggctct	attttgttgg	tttctaggat	cgccgtaatg	840
Agaricus bisporus	gaat-aataa	aa-taggaagc	t-gcggttct	attttgttgg	tttctagagt	cgccgtaatg	
Boletus satanas	gaat-aatga	aa-taggaagc	t-gcggttct	attttgttgg	tttctagagt	cgccgtaatg	
Russula compacta	gaat-aataa	aa-taggaagc	c-gcggttct	attttgttgg	tttctagagt	cgccgtaatg	
Hirneo.auricula	gaat-aataa	aaataggaagc	t-gcgg-tct	attttgttgg	tttctagagt	cgccgtaatg	
Dacry.stillatus	gaat-aatag	aa-taggaagc	t-gcgtctct	attttgttgg	tttctagtga	cgccgtaatg	
Tremella foliacea	gaat-aatag	aa-taggaagc	t-gcggttct	attttgttgg	tttctaggat	cgccgtaatg	
Ustilago maydis	gaat-aacag	aa-taggaagc	t-gcggttct	attttgttgg	tttctagaac	tgccgtaatg	
Ustilago hordei	gaat-aacag	aa-taggaagc	t-gcggttct	attttgttgg	tttctagaac	tgccgtaatg	
PB 4381	GAAT-AATAG	AA-TAGGACG	TTGCGGTCCT	ATTTTGTTGG	TTTCTAGGAT	CGCCGTAATG	
PB 3275	GAAT-AATAG	AA-TAGGACG	TTGCGGTCCT	ATTTTGTTGG	TTTCTAGGAT	CGCCGTAATG	
Gra.cylindrica	gaat-aatag	aa-taggaagc	tcgcggtcct	attttgttgg	tttctaggac	cgccgtaatg	
Gra.phoenicis	gaat-aatag	aa-taggaagc	ttgcatcct	attttgttgg	tttctaggac	cgccgtaatg	
RBF 1008	GAAT-AATAA	AA-TAGGACG	T-GCGTTTCT	ATTTTGTTGG	TTTCTAGAAT	CGCCGTAATG	
Tilletiopsis palles.	gaat-aataa	aa-taggaagc	t-gcggttct	attttgttgg	tttctaggat	cgccgtaatg	
Tilletiopsis albes.	gaat-aataa	aa-taggaagc	t-gcggttct	gttttgttgg	tttctagaat	cgccgtaatg	
Tilletia caries	gaat-aataa	aa-taggaagc	t-gcggttct	attttgttgg	tttctaggat	cgccgtaatg	
Tilletiaria anomala	gaat-aataa	aa-taggaagc	t-gcggttct	attttgttgg	tttctagaac	tgccgtaatg	
Tilletiopsis minor	gaat-aataa	aa-taggaagc	t-gcggttct	attttgttgg	tt-atagaac	cgccgtaatg	
Tilletiopsis flava	gaattaataa	aa-taggaagc	t-gcgggtct	aatgtggtgg	tttctagaac	tgccgtaatg	
Ery.hasegawianum	gaat-aataa	aa-taggaagc	t-gcggttct	attttgttgg	tttctaggat	cgccgtaatg	
Crona.ribicola	gaat-aataa	aa-taggaagc	t-gcgtcct	attttgttgg	tttctaggat	cgccgtaatg	
Rhodo.toruloides	gaat-aatag	aa-taggaagc	c-gcgttccc	attttgttgg	tttctgagat	cgccgtaatg	
Microb.violaceum	gaat-aatag	aa-taggaagc	c-gcgttccc	attttgttgg	tttctgagat	cgccgtaatg	

Schizoph.commune	attaataggg	atagttgggg	gcattggtat	tgagtcgcta	gaggtgaaat	tcttgattg	900
Agaricus bisporus	attaataggg	atagttgggg	gcattggtat	tgagtcgcta	gaggtgaaat	tcttgattg	
Boletus satanas	attaataggg	acagttgggg	gcattggtat	tcagtcgcta	gaggtgaaat	tcttgattg	
Russula compacta	attaataggg	atagttgggg	gcattggtat	tgcgttgcta	gaggtgaaat	tcttgattt	
Hirneo.auricula	attaataggg	atagttgggg	gcattcgtat	tgcgttgcta	gaggtgaaat	tcttgattt	
Dacry.stillatus	atgaataggg	acagttgggg	gcatttgtat	tcggttgcta	gaggtgaaat	tcttgattt	
Tremella foliacea	attaataggg	acggtcgggg	gcattagtat	tccgttgcta	gaggtgaaat	tcttagattt	
Ustilago maydis	attaaaaggg	acagccgggg	gcattagtat	ttgcacgcta	gaggtgaaat	tcttgattg	
Ustilago hordei	attaaaaggg	acagccgggg	gcattagtat	ttgcacgcta	gaggtgaaat	tcttgattg	
PB 4381	ATTAATAGGG	ATAGTCGGGG	GCATTAGTAT	TCACATGCTA	GAGGTGAAAT	TCTTGATT	
PB 3275	ATTAATAGGG	ATAGTCGGGG	GCATTAGTAT	TCACATGCTA	GAGGTGAAAT	TCTTGATT	
Gra.cylindrica	attaataggg	atagtcgggg	gcattcgtat	tcacatgcta	gaggtgaaat	tcttgattt	
Gra.phoenicis	attaataggg	atagtcgggg	gcattcgtat	tcacatgcta	gaggtgaaat	tcttgattt	
RBF 1008	ATTAATAGGG	ATAGTCGGGG	GCATTAGTAT	TCACATGCTA	GAGGTGAAAT	TCTTGATT	
Tilletiopsis palles.	attaataggg	acagttgggg	gcattagtat	tcacatgcta	gaggtgaaat	tcttgattt	
Tilletiopsis albes.	attaataggg	atagttgggg	gcattagtat	tcacatgcta	gaggtgaaat	tcttgattt	
Tilletia caries	attaataggg	atagttgggg	gcattagtat	tcacatgcta	gaggtgaaat	tcttgattt	
Tilletiaria anomala	attaataggg	acgattgggg	gcattagtat	tcacatgcta	gaggtgaaat	tcttgattt	
Tilletiopsis minor	attaataggg	acgattgggg	ccattagtat	tcacatgcta	gaggtgaaat	tcttgattt	
Tilletiopsis flava	attaataggg	acgattgggg	gcattagtat	tcacatgcta	gaggtgaaat	tcttgattt	
Ery.hasegawianum	attaataggg	atagttgggg	gcattcgtat	tcaattgcta	gaggtgaaat	tcttgattt	
Crona.ribicola	attaataggg	tcagttgggg	gcatttgtat	tacatcgta	gaggtgaaat	tcttgattg	
Rhodo.toruloides	attaataggg	atagttgggg	gcatttgtat	tccgtcgta	gaggtgaaat	tcttgattg	
Microb.violaceum	attaataggg	atagttgggg	gcatttgtat	tccgtcgta	gaggtgaaat	tcttgattg	

Schizoph.commune	actcaagacc	gactactgcg	aaagcatttg	ccaaggatgt	tttcattaat	caagaacgaa	960
Agaricus bisporus	actcaagacc	gactactgcg	aaagcatttg	ccaaggatgt	tttcattaat	caaggacgaa	
Boletus satanas	actgaagact	aactactgcg	aaagcatttg	ccaaggatgt	tttcattaat	caagaacgaa	
Russula compacta	acgcaagaca	aactattgcg	aaagcatttg	ccaaggatgt	tttcattaat	caagaacgaa	
Hirneo.auricula	acgcaagaca	aactttgcg	aaagcatttg	ccaaggatgt	tttcattaat	caagaacgaa	
Dacry.stillatus	accgaagaca	aactactgcg	aaagcatttg	ccaaggatgt	tttcattgat	caagaacgaa	
Tremella foliacea	acggaagact	aactttgcg	aaagcatttg	ccaaggacgt	tttcattgat	caagaacgaa	
Ustilago maydis	tgcaaagact	tcctactgcg	aaagcatttg	ccaagaatgt	tttcattaat	caagaacgaa	
Ustilago hordei	tgcaaagact	tcctactgcg	aaagcatttg	ccaagaatgt	tttcattaat	caagaacgaa	
PB 4381	TGTGAAGACT	AACTTCTGCG	AAAGCATTTG	CCAAGGATGT	TTTCATTAAT	CAAGAACGAA	
PB 3275	TGTGAAGACT	AACTTCTGCG	AAAGCATTTG	CCAAGGATGT	TTTCATTAAT	CAAGAACGAA	
Gra.cylindrica	tgtgaagacg	aactactgcg	aaagcatttg	ccaaggatgt	tttcattaat	caagaacgaa	
Gra.phoenicis	tgtgaagacg	aactactgcg	aaagcatttg	ccaaggatgt	tttcattaat	caagaacgaa	
RBF 1008	TGTGAAGACT	AACTTCTGCG	AAAGCATTTG	CCAAGGATGT	TTTCATTAAT	CAAGAACGAA	
Tilletiopsis palles.	tgtgaagact	aactttgcg	aaagcatttg	ccaaggatgt	tttcattaat	caagaacgaa	
Tilletiopsis albes.	tgtgaagact	aactttgcg	aaagcatttg	ccaaggatgt	tttcattaat	caagaacgaa	
Tilletia caries	tgtgaagact	aactactgcg	aaagcatttg	ccaaggatgt	tttcattaat	caagaacgaa	
Tilletiaria anomala	tgtgaagact	aactactgcg	aaagcatttg	ccaaggatgt	tttcattaat	caagaacgaa	
Tilletiopsis minor	tgtgaagact	aactactgcg	aaagcatttg	ccaaggatgt	tttcattaat	caagaacgaa	
Tilletiopsis flava	tgtgaagact	aactactgcg	aaagcatttg	ccaaggatgt	tttcattaat	caagaacgaa	
Ery.hasegawianum	attgaagacg	aactactgcg	aaagcatttg	ccaaggatgt	tttcattgat	caagaacgaa	
Crona.ribicola	atgtaagaca	aactactgcg	aaagcatttg	ccaaggatgt	tttcattgat	caagaacgaa	
Rhodo.toruloides	ccggaagaca	aactactgcg	aaagcatttg	ccaaggatgt	tttcattgat	caagaacgaa	
Microb.violaceum	ccggaagaca	aactactgcg	aaagcatttg	ccaaggatgt	tttcattgat	caagaacgaa	

Schizoph.commune	ggttagggga	tcgaaaacga	tcagataaccg	ttgtagtctt	aacagtaaac	tatgccgact	1020
Agaricus bisporus	ggttagggga	tcgaaaacga	tcagataaccg	ttgtagtctt	aacagtaaac	tatgccgact	
Boletus satanas	ggttagggga	tcgaaaacga	tcagataaccg	ttgtagtctt	aacagtaaac	tatgccgact	
Russula compacta	ggttagggga	tcgaaaacga	tcagataaccg	ttgtagtctt	aacagtaaac	tatgccgact	
Hirneo.auricula	ggttagggga	tcgaaaacga	tcagataaccg	ttgtagtctt	aacagtaaac	tatgccgact	
Dacry.stillatus	ggttagggga	tcgaaaacga	tcagataaccg	ttgtagtctt	aacagtaaac	tatgccgact	
Tremella foliacea	ggttagggga	tcgaaaacga	tcagataaccg	ttgtagtctt	aacagtaaac	tatgccgact	
Ustilago maydis	ggttagggga	tcgaaaacga	tcagataaccg	ttgtagtctt	aacagtaaac	tatgccgact	
Ustilago hordei	ggttagggga	tcgaaaacga	tcagataaccg	ttgtagtctt	aacagtaaac	tatgccgact	
PB 4381	GGTTAGGGGA	TCGAAAACGA	TTAGATACCG	TTGTAGTCTT	AACAGTAAAC	TATGCCGACT	
PB 3275	GGTTAGGGGA	TCGAAAACGA	TTAGATACCG	TTGTAGTCTT	AACAGTAAAC	TATGCCGACT	
Gra.cylindrica	ggttagggga	tcgaaaacga	tcagataaccg	ttgtagtctt	aacagtaaac	tatgccgact	
Gra.phoenicis	ggttagggga	tcgaaaacga	tcagataaccg	ttgtagtctt	aacagtaaac	tatgccgact	
RBF 1008	GGTTAGGGGA	TCGAAAACGA	TCAGATACCG	TTGTAGTCTT	AACAGTAAAC	TATGCCGACT	
Tilletiopsis palles.	ggttagggga	tcgaaaacga	tcagataaccg	ttgtagtctt	aacagtaaac	tatgccgact	
Tilletiopsis albes.	ggttagggga	tcgaaaacga	tcagataaccg	ttgtagtctt	aacagtaaac	tatgccgact	
Tilletia caries	ggttagggga	tcgaaaacga	tcagataaccg	ttgtagtctt	aacagtaaac	tatgccgact	
Tilletiaria anomala	ggttagggga	tcgaaaacga	tcagataaccg	ttgtagtctt	aacagtaaac	tatgccgact	
Tilletiopsis minor	ggttagggga	tcgaaaacga	tcagataaccg	ttgtagtctt	aacagtaaac	tatgccgact	
Tilletiopsis flava	ggttagggga	tcgaaaacga	tcagataaccg	ttgtagtctt	aacagtaaac	tatgccgact	
Ery.hasegawianum	ggttagggga	tcgaaaacga	tcagataaccg	ttgtagtctt	aacagtaaac	tatgccgact	
Crona.ribicola	ggttaagggt	tcgaaaacga	tcagataaccg	ttgtagtctt	aacagtaaac	tatgccgact	
Rhodo.toruloides	ggaaggggga	tcgaaaacga	tcagataaccg	ttgtagtctt	ttctgtaaac	tatgccaatt	
Microb.violaceum	ggaaggggga	tcgaaaacga	tcagataaccg	ttgtagtctt	ttctgtaaac	tatgccaatt	

Schizoph.commune	agggatcgga	cgacc-tcaa	ttat-tatgt	gtcgttcggc	accttacgag	aatcaaat	1080
Agaricus bisporus	agggatcgga	cgacc-tcaa	ttat-tatgt	gtcgttcggc	accttacgag	aatcaaat	
Boletus satanas	agggatcgga	cgacc-tc-t	tttt-gatgt	gtcgttcggc	accttacgag	aatcaaat	
Russula compacta	agggatcgga	cgacc-tc-a	gtat-tatgc	gtcgttcggc	accttacgag	aatcaaat	
Hirneo.auricula	agggatcgga	cgacc-tc-t	tttt-tatgt	gtcgttcggc	accttacgag	aatcaaat	
Dacry.stillatus	agggatcgga	cgagg-ttca	t-tt-aatga	ccggttcggc	accttacgag	aatcaaat	
Tremella foliacea	agggatcgga	ccacg-tt-a	tttt---tga	ctggctcggc	accttacgag	aatcaaat	
Ustilago maydis	ccgaatcggt	cgatg-ctca	t-ttactgg	ctcgatcggc	gcggtacgag	aatcaaat	
Ustilago hordei	ccgaatcggt	cgatg-ctca	t-ttactgg	ctcgatcggc	gcggtacgag	aatcaaat	
PB 4381	AGGGATCGGG	CGATG-TTAT	TTTTTTTTGA	CTCGCTCGGC	ACCTTGCGAG	AAATCAAAGT	
PB 3275	AGGGATCGGG	CGATG-TTAT	TTTT-T-TGA	CTCGCTCGGC	ACCTTGCGAG	AAATCAAAGT	
Gra.cylindrica	agggatcgga	cgatg-ttat	ttttt-tga	ctcgttcggc	accttacgag	aatcaaat	
Gra.phoenicis	agggatcgga	cgatg-ttat	ttttt-tga	ctcgttcggc	accttacgag	aatcaaat	
RBF 1008	AGGGATCGGG	CGATG-TTAT	T-TTCT-TGA	CTCGCTCAGC	ACCTTGCGAG	AAATCAAAGT	
Tilletiopsis palles.	agggatcgga	cgatg-ttat	t-ttct-tga	ctcgttcggc	accttacgag	aatcaaat	
Tilletiopsis albes.	agggatcgga	cgagg-ttat	t-tt-aatga	ctcgttcggc	accttacgag	aatcaaat	
Tilletia caries	agggatcgga	cgatg-ttta	t---ct-tga	ctcgttcggc	accttacgag	aatcaaat	
Tilletiaria anomala	agggatcgga	cgatg-ttat	tttt-t-tga	ctcgttcggc	accttacgag	aatcaaat	
Tilletiopsis minor	agggatcgga	cgatg-ttat	tttt-t-tga	ctcgttcggc	accttacgag	aatcaaat	
Tilletiopsis flava	agggatcgga	cgatg-ttat	tctt-t-tga	ctcgttcggc	accttacgag	aatcaaat	
Ery.hasegawianum	agggatcgga	cgaggatgtt	t----aatga	ctcgttcggc	acctgaagag	aatctttaa	
Crona.ribicola	ggggatcaga	caaggatgtt	t----aatga	ctgtgtcggc	acctgaagag	aatctttaa	
Rhodo.toruloides	ggggatcaga	caaggatgtt	t----aatga	ctgtgtcggc	acctgaagag	aatctttaa	
Microb.violaceum	ggggatcaga	caaggatgtt	t----aatga	ctgtgtcggc	acctgaagag	aatctttaa	



Schizoph.commune	ctttgggttc	tggggggagt	atggtcgcaa	ggctgaaact	taaaggaatt	gacggaaggg	1140
Agaricus bisporus	ttttgggttc	tggggggagt	atggtcgcaa	ggctgaaact	taaaggaatt	gacggaaggg	
Boletus satanas	ctttgggttc	tggggggagt	atggtcgcaa	ggctgaaact	taaaggaatt	gacggaaggg	
Russula compacta	ctttgggttc	tggggggagt	atggtcgcaa	ggctgaaact	taaaggaatt	gacggaaggg	
Hirneo.auricula	ctttgggttc	tggggggagt	atggtcgcaa	ggctgaaact	taaaggaatt	gacggaaggg	
Dacry.stillatus	ctttgggttc	tggggggagt	atggtcgcaa	ggctgaaact	taaaggaatt	gacggaaggg	
Tremella foliacea	ctttgggttc	tggggggagt	atggtcgcaa	ggctgaaact	taaaggaatt	gacggaaggg	
Ustilago maydis	tttt-ggttc	tggggggagt	atggtcgcaa	ggctgaaact	taaagaaatt	gacggaaggg	
Ustilago hordei	ttttgggttc	tggggggagt	atggtcgcaa	ggctgaaact	taaagaaatt	gacggaaggg	
PB 4381	TTTTGGGTTC	TGGGGGGAGT	ATGGTCGCAA	GGCTGAAACT	TAAAGAAATT	GACGGAAGGG	
PB 3275	TTTTGGGTTC	TGGGGGGAGT	ATGGTCGCAA	GGCTGAAACT	TAAAGAAATT	GACGGAAGGG	
Gra.cylindrica	ttttgggttc	tggggggagt	atggtcgcaa	ggctgaaact	taaagaaatt	gacggaaggg	
Gra.phoenicis	ttttgggttc	tggggggagt	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	
RBF 1008	CTTTGGGTTC	TGGGGGGAGT	ATGGTCGCAA	GGCTGAAACT	TAAAGAAATT	GACGGAAGGG	
Tilletiopsis palles.	ctttgggttc	t-gggggagt	atggtcgcaa	ggctgaaact	taaagaaatt	gacggaaggg	
Tilletiopsis albes.	ctttgggttc	tggggggagt	atggtcgcaa	ggctgaaact	taaagaaatt	gacggaaggg	
Tilletia caries	ctttgggttc	tggggggagt	atggtcgcaa	ggctgaaact	taaagaaatt	gacggaaggg	
Tilletiaria anomala	ctttgggttc	t-gggggagt	atggtcgcaa	ggctgaaact	taaagaaatt	gacggaaggg	
Tilletiopsis minor	ctttgggttc	t-gggggagt	atggtcgcaa	ggctgaaact	taaagaaatt	gacggaaggg	
Tilletiopsis flava	ctttgggttc	tggggggagt	atggtcgcaa	ggctgaaact	taaagaaatt	gacggaaggg	
Ery.hasegawianum	gtctagggttc	gggggggagt	atggtcgcaa	ggctgaaact	taaagaaatt	gacggaaggg	
Crona.ribicola	gtttagggttc	gtgggggagt	acggtcacaa	ggctgaaact	taaaggaatt	gacggaaggg	
Rhodo.toruloides	atg-aggttc	gggggggagt	atggtcgcaa	ggctgaaact	taaaggaatt	gacggaaggg	
Microb.violaceum	atg-aggttc	gggggggagt	atggtcgcaa	ggctgaaact	taaaggaatt	gacggaaggg	

Schizoph.commune	caccacca-g	gtgtggagcc	tgcggcttaa	tttga--ctc	aacacgggga	aactcaccag	1200
Agaricus bisporus	caccacca-g	gtgtggagcc	tgcggcttaa	tttga--ctc	aacacgggga	aactcaccag	
Boletus satanas	caccacca-g	gagtggagcc	tgcggcttaa	tttga--ctc	aacacgggga	aactcaccag	
Russula compacta	caccacca-g	gagtggagcc	tgcggcttaa	tttga--ctc	aacacgggga	aactcaccag	
Hirneo.auricula	caccacca-g	gagt--gcg	tgcggcttaa	tttga--ctc	aacacgggga	aactcaccag	
Dacry.stillatus	caccacca-g	gagtggagcc	tgcggcttaa	tttga--ctc	aacacgggga	aactcaccag	
Tremella foliacea	caccacca-g	gtgtggagcc	tgcggcttaa	tttga--ctc	aacacgggga	aactcaccag	
Ustilago maydis	caccacca-g	gagtggagcc	tgcggcttaa	tttga--ctc	aacacgggga	aactcaccg	
Ustilago hordei	caccacca-g	gagtggagcc	tgcggcttaa	tttga--ctc	aacacgggaa	aactcaccg	
PB 4381	CACCACCA-G	GAGTGGAGCC	TGCGGCTTAA	TTTGA--CTC	AACACGGGGA	AACTCACCAG	
PB 3275	CACCACCA-G	GAGTGGAGCC	TGCGGCTTAA	TTTGA--CTC	AACACGGGGA	AACTCACCAG	
Gra.cylindrica	caccacca-g	gagtggagcc	tncggcttaa	tttga--ctc	aacacgggga	aacncaccag	
Gra.phoenicis	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nacacgggga	aactcac-ag	
RBF 1008	CACCACCA-G	GAGTGGAGCC	TGCGGCTTAA	TTTGA--CTC	AACACGGGGA	AACTCACCAG	
Tilletiopsis palles.	caccacca-g	gagtggagcc	tgcggcttaa	tttga--ctc	aacacgggga	aactcaccag	
Tilletiopsis albes.	caccacca-g	gagtggagcc	tgcggcttaa	tttga--ctc	aacacgggga	aactcaccag	
Tilletia caries	caccacca-g	gagtggagcc	tgcggcttaa	tttga--ctc	aacacgggga	aactcaccag	
Tilletiaria anomala	caccacca-g	gagtggagcc	tgcggcttaa	tttga--ctc	aacacgggga	aactcaccag	
Tilletiopsis minor	caccacca-g	gagta-agcc	tgcggcttaa	tttga--ctc	aacacgggga	aactcaccag	
Tilletiopsis flava	caccacca-g	gagtggagcc	tgcggcttaa	tttga--ctc	aacacgggga	aactcaccag	
Ery.hasegawianum	caccaccatg	gtgtggagcc	tgcggcttaa	tttga--ctc	aacacgggga	aactcaccag	
Crona.ribicola	caccacca-g	gtgtggagcc	tgcggcttaa	tttga--ctc	aacacgggga	aactcaccag	
Rhodo.toruloides	caccacca-g	gtgtggagcc	tgcggcttaa	tttga--ctc	aacacgggga	aactcaccag	
Microb.violaceum	caccacca-g	gtgtggagcc	tgcggcttaa	tttga--ctc	aacacgggga	aactcaccag	

Schizoph.commune	gtccagacat	aactaggatt	gacagattga	tagctctttc	atgattttat	gggtggtggt	1260
Agaricus bisporus	gtccagacat	aactaggatt	gacagattga	tagctctttc	atgattttat	gggtggtggt	
Boletus satanas	gtccagacat	gactaggatt	gacagattga	tagctctttc	atgattttat	gggtggtggt	
Russula compacta	gtccagacat	aactaggatt	gacagattga	tagctctttc	ttgattttat	gggtggtggt	
Hirneo.auricula	gtccagacat	gactaggatt	gacagattga	tagctctttc	ttgattttat	gggtggtggt	
Dacry.stillatus	gtccagacat	agtaaggatt	gacagattga	gagctctttc	atgattctgt	gggtggtggt	
Tremella foliacea	gtccagacat	agtaaggatt	gacagattga	tagctctttc	ttgattctat	gggtggtggt	
Ustilago maydis	gtccagacat	agtaaggatt	gacagattga	tggcgctttc	atgattctat	gggtggtggt	
Ustilago hordei	gtccagacat	agtaaggatt	gacagattga	tggcgctttc	atgattctat	gggtggtggt	
PB 4381	GTCCAGACAT	AGTAAGGATT	GACAGATTGA	TAGCTCTTTC	TTGATTCTAT	GGGTGGTGGT	
PB 3275	GTCCAGACAT	AGTTAGGATT	GACAGATTGA	TAGCTCTTTC	TTGATTCTAT	GGGTGGTGGT	
Gra.cylindrica	gtccagacat	agtaaggatt	gacagattga	tagctctttc	ttgattctat	gggtggtggt	
Gra.phoenicis	gtc-agacac	gacaaggatt	gacagattga	tagctctttc	ttgattctgt	gggtggtggt	
RBF 1008	GTCCAGACAT	AGTAAGGATT	GACAGATTGA	TAGCTCTTTC	TTGATTCTAT	GGGTGGTGGT	
Tilletiopsis palles.	gtccagacat	agtaaggatt	gacagattga	tagctctttc	ttgattctat	gggtggtggt	
Tilletiopsis albes.	gtccagacat	agtaaggatt	gacagattga	tagctctttc	ttgattctat	gggtggtggt	
Tilletia caries	gtccagacat	agtaaggatt	gacagattga	tagctctttc	ttgattctat	gggtggtggt	
Tilletiaria anomala	gtccagacat	agtaaggatt	gacagattga	tagctctttc	ttgattctat	gggtggtggt	
Tilletiopsis minor	gtccagacat	agtaaggatt	gacagattga	tagctctttc	ttgattctat	gggtggtggt	
Tilletiopsis flava	gtccagacat	agtaaggatt	gacagattga	tagctctttc	ttgattctat	gggtggtggt	
Ery.hasegawianum	gtccagacac	gacaaggatt	gacagattga	tagctctttc	ttgattctgt	gggtggtggt	
Crona.ribicola	gtccagacac	agtaaggatt	gacagattga	tagctctttc	ttgattttgt	gggtggtggt	
Rhodo.toruloides	gtccagacac	aataaggatt	gacagattga	tagctctttc	ttgatcttgt	gggtggtggt	
Microb.violaceum	gtccagacac	aataaggatt	gacagattga	tagctctttc	ttgatcttgt	gggtggtggt	

Schizoph.commune	gcatggccgt	tcttagttgg	tggagtgatt	tgtctgggta	attccgataa	cgaa-cgaga	1320
Agaricus bisporus	gcatggccgt	tcttagttgg	tggagtgatt	tgtctgggta	attccgataa	cgaa-cgaga	
Boletus satanas	gcatggccgt	tcttagttgg	tggagtgatt	tgtctgggta	attccgataa	cgaa-cgaga	
Russula compacta	gcatggccgt	tcttagttgg	tggagtgatt	tgtctgggta	attccgataa	cgaa-cgaga	
Hirneo.auricula	gcatggccgt	tcttagttgg	tggagtgatt	tgtctgggta	attccgataa	cgaa-cgaga	
Dacry.stillatus	gcatggccgt	tcttagttgg	tggagtgatt	tgtctgggta	attccgataa	cgaa-cgaga	
Tremella foliacea	gcatggccgt	tcttagttgg	tggagtgatt	tgtctgggta	attccgataa	cgaa-cgaga	
Ustilago maydis	gcatggccgt	tcttagttgg	tggagtgatt	tgtctgggta	attccgataa	cgaa-cgaga	
Ustilago hordei	gcatggccgt	tcttagttgg	tggagtgatt	tgtctgggta	attccgataa	cgaa-cgaga	
PB 4381	GCATGGCCGT	TCTTAGTTGG	TGGAGTGATT	TGTCTGGTTA	ATTCCGATAA	CGAA-CGAGA	
PB 3275	GCATGGCCGT	TCTTAGTTGG	TGGAGTGATT	TGTCTGGTTA	ATTCCGATAA	CGAA-CGAGA	
Gra.cylindrica	gcatggccgt	tcttagttgg	tggagtgatt	tgtctgggta	attccgataa	cgaagcgaga	
Gra.phoenicis	gcatggccgt	tcttagttgg	tggagtgatt	tgtctgggta	attccganaa	cgaa-cgaga	
RBF 1008	GCATGGCCGT	TCTTAGTTGG	TGGAGTGATT	TGTCTGGTTA	ATTCCGATAA	CGAA-CGAGA	
Tilletiopsis palles.	gcatggccgt	tcttagttgg	tggagtgatt	tgtctgggta	attccgataa	cgaa-cgaga	
Tilletiopsis albes.	gcatggccgt	tcttagttgg	tggagtgatt	tgtctgggta	attccgataa	cgaa-cgaga	
Tilletia caries	gcatggccgt	tcttagttgg	tggagtgatt	tgtctgggta	attccgataa	cgaa-cgaga	
Tilletiaria anomala	gcatggccgt	tcttagttgg	tggagtgatt	tgtctgggta	attccgataa	cgaa-cgaga	
Tilletiopsis minor	gcatggccgt	tcttagttgg	tggagtgatt	tgtctgggta	attccgataa	cgaa-cgaga	
Tilletiopsis flava	gcatggccgt	tcttagttgg	tggagtgatt	tgtctgggta	attccgataa	cgaa-cgaga	
Ery.hasegawianum	gcatggccgt	tcttagttgg	tggagtgatt	tgtctgggta	attccgataa	cgaa-cgaga	
Crona.ribicola	gcatggccgt	tcttagttgg	tggagtgatt	tgtctgggta	attccgataa	cgaa-cgaga	
Rhodo.toruloides	gcatggccgt	tcttagttgg	tggagtgatt	tgtctgggta	attccgataa	cgaa-cgaga	
Microb.violaceum	gcatggccgt	tcttagttgg	tggagtgatt	tgtctgggta	attccgataa	cgaa-cgaga	

Schizoph.commune	cc-ttaacct	gctaaatagc	caggccggct	t-ttgcctgt	c--ttatggc	ttcttagagg	1380
Agaricus bisporus	cc-ttaacct	gctaaatagc	caggccggct	t-ttgcctgt	c---gcagcc	ttcttagagg	
Boletus satanas	cc-ttaacct	gctaaatagc	caggccggct	t-ttgcctgt	c---ttcggc	ttcttagagg	
Russula compacta	cc-ttaacct	gctaaatagc	ctggccggct	c-ttgcctgt	c---accggc	ttcttagagg	
Hirneo.auricula	cccttaacct	gctaaatagc	caggccggct	t-cgcctgtg	c---gccggc	ttcttagagg	
Dacry.stillatus	cc-ttaacct	gctaaatagc	caggccggct	t-tgctgtgt	c---gacggc	ttcttagagg	
Tremella foliacea	cc-ttaacct	gctaaatagt	caggccggcc	t-tggctgtg	c---gtaggc	ttcttagagg	
Ustilago maydis	cc-ttgacct	gctaaataga	cgggttgaca	ttttgttggc	cccttatgtc	ttcttagagg	
Ustilago hordei	cc-ttgacct	gctaaataga	cgggttgaca	atttgttggc	cccttatgtc	ttcttagagg	
PB 4381	CC-TTAACCT	GCTAAATAGC	CGGTCGACT	T-TGGTTGAC	TTTTTTTAGGC	TTCTTAGAGG	
PB 3275	CC-TTAACCT	GCTAAATAGC	CGGTCGACT	T-TGGTTGAC	TTTTTTTAGGC	TTCTTAGAGG	
Gra.cylindrica	cc-ttaacct	gctaaatagc	cgagtcgact	t-tcgttggc	t---tctggc	ttcttagagg	
Gra.phoenicis	cn-ttaacct	gctaaatagc	cggcccgact	t-tggttgg	c---gctggc	ttcttagagg	
RBF 1008	CC-TTAACCT	GCTAAATAGC	CGGCCGACT	A-TGGTTAGC	C---GCTGGC	TTCTTAGAGG	
Tilletiopsis palles.	cc-ttaacct	gctaaatagc	cggcccgact	t-tggttagc	c---gctggc	ttcttagagg	
Tilletiopsis albes.	cc-ttaacct	gctaaatagc	cggcccgact	t-tggttagc	c---gctggc	ttcttagagg	
Tilletia caries	cc-ttaacct	gctaaatagc	cggcccgact	t-tggttagc	t---gctggc	ttcttagagg	
Tilletiaria anomala	cc-ttaacct	gctaaatagc	cggcccgact	t-tggttagc	c---gctggc	ttcttagagg	
Tilletiopsis minor	cc-ttaacct	gctaaatagc	cggcccgact	t-tggttagc	c---gctggc	ttcttagagg	
Tilletiopsis flava	cc-ttaacct	gctaaatagc	cggcccgact	t-tggttagc	c---gctggc	ttcttagagg	
Ery.hasegawianum	cc-ttaacct	gctaaatagc	cggcccgact	t-tggttagc	c---gctggc	ttcttagagg	
Crona.ribicola	cc-ttctcct	gctaaatagt	ctagctggct	a-cggctggc	t---attggc	ttcttagagg	
Rhodo.toruloides	cc-ttaacct	gctaaataga	ccagccggct	t-tgcttagc	t---gctgtc	ttcttagagg	
Microb.violaceum	cc-ttaacct	gctaaatagt	cccgccggct	t-tgcttagc	g---gctgac	ttcttagagg	

Schizoph.commune	gactgtaggc	-gtctagctt	acggaagttt	gaggcaataa	caggtctgtg	atgcccttag	1440
Agaricus bisporus	gactgtcagc	-gtctagctg	acggaagttt	gaggcaataa	caggtctgtg	atgcccttag	
Boletus satanas	gactgtcggc	-gtctagccg	acggaagttt	gaggcaataa	caggtctgtg	atgcccttag	
Russula compacta	gactgtcggc	-gtctanccg	acggaagttt	gaggcaataa	caggtctgtg	atgcccttag	
Hirneo.auricula	gactatcagc	-gtctagt--	atggaagttt	gaggcaataa	caggtctgtg	atgcccttag	
Dacry.stillatus	gactgtcagc	-gactagctg	acggaagttt	gaggcaataa	caggtctgtg	atgcccttag	
Tremella foliacea	gactaacagc	-gtttagctg	ttggaagttt	gaggcaataa	caggtctgtg	atgcccttag	
Ustilago maydis	gacaatcgac	cgtctaggtg	atggaggcaa	aaggcaataa	caggtctgtg	atgcccttag	
Ustilago hordei	gacaatcgac	cgtctaggtg	atggaggcaa	aaggcaataa	caggtctgtg	atgcccttag	
PB 4381	GACTATCTGC	-GTTTAGCAG	ATGGAAGTTT	GAGGCAATAA	CAGGTCTGTG	ATGCCCTTAG	
PB 3275	GACTATCTGC	-GTTTAGCAG	ATGGAAGTTT	GAGGCAATAA	CAGGTCTGTG	ATGCCCTTAG	
Gra.cylindrica	gactatctac	-gtttagtag	atggaagttt	gaggcaataa	caggtctgtg	atgcccttag	
Gra.phoenicis	gactatcgac	-gtctagtctg	atggaagttt	gaggcaataa	caggtctgtg	atgcccttag	
RBF 1008	GACTATGGC	-GTTTAGCTA	ATGGAAGTTT	GAGGCAATAA	CAGGTCTGTG	ATGCCCTTAG	
Tilletiopsis palles.	gactattagc	-gtttagcta	atggaagttt	gaggcaataa	caggtctgtg	atgcccttag	
Tilletiopsis albes.	gactattggc	-gtttagcta	atggaagttt	gaggcaataa	caggtctgtg	atgcccttag	
Tilletia caries	gactattggc	-gtctagcta	atggaagttt	gaggcaataa	caggtctgtg	atgcccttag	
Tilletiaria anomala	gactattagc	-gtgtagcta	atggaagttt	gaggcaataa	caggtctgtg	atgcccttag	
Tilletiopsis minor	gactattggc	-gtttagcta	atggaagttt	gaggcaataa	caggtctgtg	atgcccttag	
Tilletiopsis flava	gactattagc	-gtgtagcta	atggaagttt	gaggcaataa	caggtctgtg	atgcccttag	
Ery.hasegawianum	gactatcagc	-gtttagctg	atggaagttt	gaggcaataa	caggtctgtg	atgcccttag	
Crona.ribicola	gactatcaac	-gtttagttg	atggaagttg	gaggcaataa	caggtctgtg	atgcccttag	
Rhodo.toruloides	gactatcagc	-gtttagctg	atggaagttt	gaggcaataa	caggtctgtg	atgcccttag	
Microb.violaceum	gactatcagc	-gtttagctg	atggaagttt	gaggcaataa	caggtctgtg	atgcccttag	

Schizoph.commune	atgttctggg	ccgcacgcgc	gctacactga	cagaggcagc	gagttct-tt	tccttgccg	1500
Agaricus bisporus	atgttctggg	tcgcacgcgc	gctacactga	cagagccagc	gagtttt-tc	accttgccg	
Boletus satanas	atgttctggg	ccgcacgcgc	gctacactga	cagagccagc	gagttct-tt	tccttgccg	
Russula compacta	atgttctggg	ccgcacgcgc	gctacactga	cagagccagc	gagttcc-tt	tccttgccg	
Hirneo.auricula	atgttctggg	ccgcacgcgc	gcnacactga	cagagccagc	gagtttt-ta	accttgccg	
Dacry.stillatus	atgttctggg	ccgcacgcgc	gctacactga	cagagccagc	gagttct--a	accttgccg	
Tremella foliacea	atgttctggg	ccgcacgcgc	gctacactga	ctgagccagc	gagtata-cc	accttgccg	
Ustilago maydis	atgttccggg	ctgcacgcgc	gctacactga	cagagacaac	gagtggg-gc	cccttgccg	
Ustilago hordei	atgttccggg	ctgcacgcgc	gctacactga	cagagacaac	gagtggg-tc	cccttgccg	
PB 4381	ATGTTCTGGG	CCGCACGCGC	GCTACACTGA	CAGAGCCAAC	GAGTTTT-TT	TCCTTGTCGG	
PB 3275	ATGTTCTGGG	CCGCACGCGC	GCTACACTGA	CAGAGCCAAC	GAGTTTT-TT	TCCTTGTCGG	
Gra.cylindrica	atgttctggg	ccgcacgcgc	gctacactga	cagagccagc	gagnttt-tt	tccttgccg	
Gra.phoenicis	atgttctggg	ccgcacgcgc	gctacactga	ccgaaccagc	gagttaa-nt	tccttgccg	
RBF 1008	ATGTTCTGGG	CCGCACGCGC	GCTACACTGA	CGGAGCCAGC	GAGTTTA-TC	ACCTTGTCGG	
Tilletiopsis palles.	atgttctggg	ccgcacgcgc	gctacactga	cggagccagc	gagttaa-tc	accttgccg	
Tilletiopsis albes.	atgttctggg	ccgcacgcgc	gctacactga	cggagccagc	gagttaa-tc	accttgccg	
Tilletia caries	atgttctggg	ccgcacgcgc	gctacactga	cggagccaac	gagttaa-tc	accttgccg	
Tilletiaria anomala	atgttctggg	c-gcacgcgc	gctacactga	cggagccagc	gagtaatttc	accttgccg	
Tilletiopsis minor	atgttctggg	ccgcacgcgc	gctacactga	cggagccagc	gagttaa-tc	accttgccg	
Tilletiopsis flava	atgttctggg	cggaacgcgc	gctacactga	cggagccagc	gagtaatttc	accttgccg	
Ery.hasegawianum	atgttctggg	ccgcacgcgc	gctacactga	ccgaaccagc	gagttaa-tc	accttagccg	
Crona.ribicola	atgttctggg	ccgcacgcgc	gctacactga	ccaagccagc	gagtata-tc	accttatccg	
Rhodo.toruloides	atgttctggg	ccgcacgcgc	gctacactga	cagagccagc	gagtcta-cc	accttgccg	
Microb.violaceum	atgttctggg	ccgcacgcgc	gctacactga	cagagccagc	gagtatttc	accttgccg	

Schizoph.commune	gaaggtc-cg	ggtaatcttg	tgaactctg	tcgtgctggg	gatagagcat	tgcaattatt	1560
Agaricus bisporus	gaaggtc-tg	ggtaatcttg	tgaactctg	tcgtgctggg	gatagagcat	tgcaattatt	
Boletus satanas	gaaggtc-tg	ggtaatcttg	tgaactctg	tcgtgctggg	gatagagcat	tgcaattatt	
Russula compacta	gaaggtcatg	ggtaatcttg	tgaactctg	tcgtgctggg	gataaagcat	tgcaattatt	
Hirneo.auricula	gaa-gtc-tg	ggtaatcttg	tgaactctg	tcgtgctggg	gatagagcat	tgcaattatt	
Dacry.stillatus	gaaggtc-cg	ggtaatcttg	tgaactctg	tcgtgctggg	gatagagcat	tgcaattatt	
Tremella foliacea	aaaggtc-tg	ggtaatcttg	tgaactcag	tcgtgctggg	gatagagcat	tgcaattatt	
Ustilago maydis	aaatgac-tg	ggtaacttg	tgaactttg	tcgtgctggg	gatggagctt	tgtaattttt	
Ustilago hordei	aaatgac-tg	ggtaacttg	tgaactttg	tcgtgctggg	gatggagctt	tgtaattttt	
PB 4381	GAAGGAC-TG	GGTAATCTTG	TGAAACTTTG	TCGTGCTGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	
PB 3275	GAAGGAC-TG	GGTAATCTTG	TGAAACTCTG	TCGTGCTGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	
Gra.cylindrica	gaaggac-tg	ggtaatcttg	ttaaactctg	tcgtgctggg	gatagagcat	tgcaattatt	
Gra.phoenicis	gaaggacatg	ggtaatcntg	tnaaantcng	tcgtgntggg	gatagagcat	tgcaattatt	
RBF 1008	GAAGGAC-TG	GGTAATCTTG	TGAAACTTTG	TCGTGCTGGG	GATAGAGCAT	TGCAATTATT	
Tilletiopsis palles.	gaaggac-tg	ggtaatcttg	tgaactttg	tcgtgctggg	gatagagcat	tgcaattatt	
Tilletiopsis albes.	gaaggac-tg	ggtaatcttg	tgaactttg	tcgtgctggg	gatagagcat	tgcaattatt	
Tilletia caries	aaaggac-tg	ggtaatcttg	tgaactttg	tcgtgctggg	gatagagcat	tgcaattatt	
Tilletiaria anomala	gaaggac-tg	ggtaatcttg	tgaactctg	tcgtgctggg	gatagagcat	tgcaattatt	
Tilletiopsis minor	gaaggac-tg	ggtaatcttg	tgaactttg	tcgtgctggg	gatagagcat	tgcaattatt	
Tilletiopsis flava	gaaggac-tg	ggtaatcttg	tgaactctg	tcgtgctggg	gatagagcat	tgcaattatt	
Ery.hasegawianum	gaaggac-tg	ggtaatcttg	tgaactcag	tcgtgatggg	gatagagcat	tgcaattatt	
Crona.ribicola	aaaggat-tg	ggtaatcttg	tgaactttg	tcgtgatggg	gatagagcat	tgcaattatt	
Rhodo.toruloides	gaaggc-atg	ggtaatcttg	tgaactctg	tcgtgatggg	gatagagcat	tgcaattatt	
Microb.violaceum	gaaggcc-cg	ggtaatcttg	tgaactctg	tcgtgatggg	gatagaacat	tgcaattatt	

Schizoph.commune	gctcttcaac	gaggaa-tac	ctagtaagcg	tgagtcatca	gctcgcggtg	attacgtccc	1620
Agaricus bisporus	gctcttcaac	gaggaa-tac	ctagtaagcg	tgagtcatca	gctcgcggtg	attacgtccc	
Boletus satanas	gctcttcaac	gaggaa-ttc	ctagtaagcg	tgagtcatca	gctcgcggtg	attacgtccc	
Russula compacta	gctctncaac	naggaaattc	ctagtaagcg	tgantcatca	gctcgcggtg	attacntccc	
Hirneo.auricula	gctcttcaac	gaggaa-ttc	ctagtaggcg	tgagtcatca	gctcgcggtg	attacgtccc	
Dacry.stillatus	gctcttcaac	gaggaa-ttc	ctagtaggcg	tgagtcatca	gctcgcggtg	attacgtccc	
Tremella foliacea	gctcttcaac	gaggaa-tac	ctagtaagcg	tgagtcatca	gctcgcggtg	attacgtccc	
Ustilago maydis	gctcttcaac	gaggaa-ttc	ctagtaagcg	caagtcatca	gcttgcggtg	actacgtccc	
Ustilago hordei	gctcttcaac	gaggaa-ttc	ctagtaagcg	caagtcatca	gcttgcggtg	actacgtccc	
PB 4381	GCTCTTCAAC	GAGGAA-TTC	CTAGTAAGCG	TAAGTCATCA	GCTTGCGTTG	ATTACGTCCC	
PB 3275	GCTCTTCAAC	GAGGAA-TTC	CTAGTAAGCG	TAAGTCATCA	GCTTGCGTTG	ATTACGTCCC	
Gra.cylindrica	gctcttcaac	gaggaa-ttc	ctagtaagcg	taagtcatca	gcttgcggtg	attacgtccc	
Gra.phoenicis	gctcttcaac	gaggaa-tac	ctagtaagcg	tgagtcatca	gctcgcggtg	aattcgtccc	
RBF 1008	GCTCTTCAAC	GAGGAA-TTC	CTAGTAAGCG	TAAGTCATCA	GCTTGCGTTG	ATTACGTCCC	
Tilletiopsis palles.	gctcttcaac	gaggaa-ttc	ctagtaagcg	tgagtcatca	gctcgcggtg	attacgtccc	
Tilletiopsis albes.	gctcttcaac	gaggaa-ttc	ctagtaagcg	tgagtcatca	gctcgcggtg	attacgtccc	
Tilletia caries	gctcttcaac	gaggaa-ttc	ctagtaagcg	tgagtcatca	gctcgcggtg	attacgtccc	
Tilletiaria anomala	gctcttcaac	gaggaa-ttc	ctagtaagcg	taagtcatca	gcttgcggtg	attacgtccc	
Tilletiopsis minor	gctcttcaac	gaggaa-ttc	ctagtaagcg	taagtcatca	gcttgcggtg	attacgtccc	
Tilletiopsis flava	gctcttcaac	gaggaa-ttc	ctagtaagcg	taagtcatca	gcttgcggtg	attacgtccc	
Ery.hasegawianum	gctcttcaac	gaggaa-tac	ctagtaagcg	tgagtcatca	gctcgcggtg	aatacgtccc	
Crona.ribicola	gctcttcaac	gaggaa-tac	ctagtaagcg	tatgtcatca	gcatgcggtg	attacgtccc	
Rhodo.toruloides	gctcttcaac	gaggaa-tac	ctagtaagcg	tgattcatca	gatcgcggtg	attacgtccc	
Microb.violaceum	gctcttcaac	gaggaa-tac	ctagtaagcg	tgattcatca	gatcgcggtg	attacgtccc	

Schizoph.commune	tgccctttgt	acacaccgcc	cgtcgctact	accgattgaa	tggttagtg	aggctctcgg	1680
Agaricus bisporus	tgccctttgt	acacaccgcc	cgtcgctact	accgattgaa	tggttagtg	aggctctcgg	
Boletus satanas	tgccctttgt	acacaccgcc	cgtcgctact	accgattgaa	tggttagtg	aggctctcgg	
Russula compacta	tgccctttgt	acacaccgcc	cgtcgctact	accgattgaa	tggttagtg	aggctctcgg	
Hirneo.auricula	tgccctttgt	acacaccgcc	cgtcgctact	accgattgaa	tggttagtg	aggctctcgg	
Dacry.stillatus	tgccctttgt	acacaccgcc	cgtcgctact	accgattgaa	tggttagtg	aggctctcgg	
Tremella foliacea	tgccctttgt	acacaccgcc	cgtcgctact	accgattgaa	tggttagtg	aggctctcgg	
Ustilago maydis	tgccctttgt	acacaccgcc	cgtcgctact	accgattgaa	tggttagtg	aggctctcgg	
Ustilago hordei	tgccctttgt	acacaccgcc	cgtcgctact	accgattgaa	tggttagtg	aggctctcgg	
PB 4381	TGCCCTTTGT	ACACACCGCC	TGTCGCTACT	ACCGATTGAA	TGGTTTAGTG	AG-CCTTTGG	
PB 3275	TGCCCTTTGT	ACACACCGCC	TGTCGCTACT	ACCGATTGAA	TGGTTTAGTG	AG-CCTTTGG	
Gra.cylindrica	tgccctttgt	acacaccgcc	cgtcgctact	accgattgaa	tggttagtg	ag-tccttgg	
Gra.phoenicis	tgccctttgt	acacaccgcc	cgtcgctact	accgattgaa	tggttagtg	ag-tccttgg	
RBF 1008	TGCCCTTTGT	ACACACCGCC	TGTCGCTACT	ACCGATTGAA	TGGTTTAGTG	AG-CCTTTGG	
Tilletiopsis palles.	tgccctttgt	acacaccgcc	cgtcgctact	accgattgaa	tggttagtg	ag-cctttgg	
Tilletiopsis albes.	tgccctttgt	acacaccgcc	cgtcgctact	accgattgaa	tggttagtg	ag-tccttgg	
Tilletia caries	tgccctttgt	acacaccgcc	cgtcgctact	accgattgaa	tggttagtg	ag-cctttgg	
Tilletiaria anomala	tgccctttgt	acacaccgcc	cgtcgctact	accgattgaa	tggttagtg	ag-tccttgg	
Tilletiopsis minor	tgccctttgt	acacaccgcc	cgtcgctact	accgattgaa	tggttagtg	ag-tccttgg	
Tilletiopsis flava	tgccctttgt	acacaccgcc	cgtcgctact	accgattgaa	tggttagtg	ag-tccttgg	
Ery.hasegawianum	tgccctttgt	acacaccgcc	cgtcgctact	accgattgaa	tggttagtg	aggctctcgg	
Crona.ribicola	tgccctttgt	acacaccgcc	cgtcgctact	accgattgaa	tggttagtg	aggctctcgg	
Rhodo.toruloides	tgccctttgt	acacaccgcc	cgtcgctact	accgattgaa	tggttagtg	aggctctcgg	
Microb.violaceum	tgccctttgt	acacaccgcc	cgtcgctact	accgattgaa	tggttagtg	aggctctcgg	

Schizoph.commune	-atcggtttt	ggggagccgg	caacggca-c	ctcattgctg	agaagttgat	caaacttggg	1740
Agaricus bisporus	-attggcttt	ggggaaccgg	caacggcg-c	cctattgctg	agaagctgat	caaacttggg	
Boletus satanas	-attggcttc	ggggagccgg	cgacggca-c	cctgttgctg	agaagctgat	caaacttggg	
Russula compacta	-attggctttt	ggaaagtccg	cnacnacn-c	cccgttgcca	anaagttggt	caaacttggg	
Hirneo.auricula	-atcggcagc	ggggagccgg	caacggca-c	cttgttgctg	agaagctgat	caaacttggg	
Dacry.stillatus	-attggcttt	ggggaaccgg	caacggta-c	gctattgctg	aaaagttgat	caaacttggg	
Tremella foliacea	-attggcggt	ggggaaccgg	caacggca-t	ccctggccg	agaagctgat	caaacttggg	
Ustilago maydis	agagtacatc	ggggagccag	caatggca-c	cctgacggct	caaactctta	caaacttggg	
Ustilago hordei	agagtacatc	ggggagccag	cgatggca-c	cctgacggct	caaactctta	caaacttggg	
PB 4381	GATTGGCGTT	TGGGAGCCGG	CAACGGCA-C	CTAATTGCTG	AAAACCTATG	CAAACCTGAT	
PB 3275	GATCGGCGTT	TGGGAGCTGG	CAACAGCA-C	CTGAGTGCTG	AAAACCTATG	CAAACCTGAT	
Gra.cylindrica	gactggcggg	cgggagccgg	caacggca-c	ctggctgctg	gaaacttggg	caaacttggg	
Gra.phoenicis	gattgacatg	ttactgctgg	caacggcggt	ttctttgctg	agaagttagg	caaacttggg	
RBF 1008	GACTGGCGTC	TGGGAGCCGG	CAACGGCA-C	CTGGATGCTG	GGAACCTGTG	CAAACCTGGT	
Tilletiopsis palles.	gattggcggt	cgggagccgg	caac-gca-c	ctgattgctg	aaaacttatg	caaacttggg	
Tilletiopsis albes.	gattggcgat	cgggagccgg	caac-gca-c	ctgattgctg	agaacttggg	caaacttggg	
Tilletia caries	gagggcggtt	tcggagctgg	caacggca-c	ctgaacgccc	ccaacttatg	caaacttggg	
Tilletiaria anomala	gattggcctt	cgcgagcccg	caagcaca--	atgagggctg	aaaacttggg	caaacttggg	
Tilletiopsis minor	gattgatcgc	cgcgagcccg	caagggca-c	atgagggctg	aaaacttggg	caaacttggg	
Tilletiopsis flava	gattggcctt	cgcgagcccg	aaacggca-c	atgagggctg	aaaacttggg	caaacttggg	
Ery.hasegawianum	-attggcttc	ggggagccgg	caacggca-c	ctagtcgctg	agaagttgaa	cgaacttggg	
Crona.ribicola	-agagcctat	aaagagctgg	caacagca-c	ttactggtt	caaagttcta	caaacttggg	
Rhodo.toruloides	-attggctat	tgggagctcg	cgagagca-c	ctgactgccc	agaagttgta	cgaacttggg	
Microb.violaceum	-attggctat	ggggatccct	tgcgggaa-t	cccactgctg	agaagttgta	cgaacttggg	

Schizoph.commune	catttagagg	aagtaaaagt	cgta	1764
Agaricus bisporus	catttagagg	aagtaaaagt	cgta	
Boletus satanas	catttagagg	aagtaaaagt	cgta	
Russula compacta	catttanagg	aagtaaaant	cnta	
Hirneo.auricula	catttagagg	aagtaaaagt	cgta	
Dacry.stillatus	catttagagg	aagtaaaagt	cgta	
Tremella foliacea	catttagagg	aagtaaaagt	cgta	
Ustilago maydis	catttagagg	aagtaaaagt	cgta	
Ustilago hordei	catttagagg	aagtaaaagt	cgta	
PB 4381	CATTTAGAGG	AAGTAAAAGT	CATA	
PB 3275	CATTTAGAGG	AAGTAAAAGT	CATA	
Gra.cylindrica	catttagagg	aagtaaaagt	cata	
Gra.phoenicis	catttagagg	aagtgaaggt	cgta	
RBF 1008	CATTTAGAGG	AAGTAAAAGT	CATA	
Tilletiopsis palles.	catttagagg	aagtaaaagt	cata	
Tilletiopsis albes.	catttagagg	aagtaaaagt	cgta	
Tilletia caries	catttagagg	aagtaaaagt	cata	
Tilletiaria anomala	catttagagg	aagtacaagt	cata	
Tilletiopsis minor	catttagagg	aagtacaagt	cata	
Tilletiopsis flava	catttagagg	aagtacaagt	cata	
Ery.hasegawianum	catttagagg	aagtaaaagt	cgta	
Crona.ribicola	catttagagg	aagtaaaagt	cgta	
Rhodo.toruloides	catttagagg	aagtaaaagt	cgta	
Microb.violaceum	catttagagg	aagtaaaagt	cgta	

# Anhang XVI

## Sequenzen der ITS-Region ausgewählter Stämme

Die in dieser Arbeit erstellten Sequenzen der ITS-Regionen für die Stämme mit rund 600 bp großen ITS-Regionen sind in Alignment 1 zusammengestellt und diejenigen für die Stämme mit rund 700 bp großen ITS-Regionen in Alignment 2. Die rund 800 bp lange Sequenz von Stamm RBF 726 ist separat angegeben.

Alignmentpositionen, die mit der jeweils ersten Sequenz (PB 5634 bzw. RBF 1008) identisch sind = „•“, fehlende Daten = „?“, Gap = „-“. Die flankierenden Primerbindungsstellen ITS5 und ITS4 sind angegeben (Kleinbuchstaben), die kodierenden Bereiche der 18S, 5.8S und 26S rDNA sind durch Unterstreichung gekennzeichnet.

### Alignment 1:

PB 5634	ggaagtaaaa gtcgtaacaa	<u>ggTTTCNGTA</u>	<u>GGTGAACCTG</u>	<u>CAGAAGGATC</u>	<u>ATTATTTGAAT</u>
PB 4380		????????	????????		
PB 4381		...T...			
FO 31767		...T...			
PB 3275		...T...			
PB 1828		???????? ?			
PB 4153		...T...			
FO 31778		...T...			
PB 3385		...T...			
PB 5634	TG--T-AAAA	TGGGGAGTCG	CTTTCGAGCA	CTCCTCTACT	TTC-TTTATT
PB 4380					
PB 4381					
FO 31767					
PB 3275	..TT.A....			...A	...T....
PB 1828	..TT.....			...A	...T....
PB 4153	....A....	C.....T.		...A	...-....
FO 31778	....A....	C.....T.		...A	...-....
PB 3385	....A....	C...A...T.		..T.....	..A...-...G....
PB 5634	CTGTGAATCG	TTGCTGAGTT	CGCTCAGTGG	CA-CA-ATTT	ATACACAC-T
PB 4380					
PB 4381				...A...A.	..-C....
FO 31767				...A...A.	..-C....
PB 3275		.....C		...TTT...	..C.C..TC..
PB 1828				..C.TTT...	..C.....AC
PB 4153		.....C		..C.TTT...	...-...AC
FO 31778		.....C		..C.TTT...	...-...AC
PB 3385			T.....	..C..TT...	..--...AC
PB 5634	TTAGAACGTA	AAAAAAC-A	-AAAAACAAA	AATATAACTT	TTGACAACGG
PB 4380	Y.....				
PB 4381	..T.....	-.....			
FO 31767	..T.....	-.....			
PB 3275		C--.-...T-	T-.T..T..	-...C....	
PB 1828		--.-.-T-	T..T..T..	-...C....	
PB 4153		--.-.-T-	T-.T..-..	-...C....	
FO 31778		--.-.-T-	T-.T..-..	-...C....	
PB 3385	C.....-	TT..T..T.	T.....	T...C....	

PB 5634 TCTCCCATCG ATGAAGAACG CAGCGAAATG CGATAAGTAA TGTGAATTGC AGAATTCAGT  
 PB 4380 .....  
 PB 4381 .....  
 FO 31767 .....  
 PB 3275 .....  
 PB 1828 .....  
 PB 4153 .....  
 FO 31778 .....  
 PB 3385 .....

PB 5634 GAATCATCGA ATCTTTGAAC GCACCTTGCG CTCCTTGGTA TTCCTTGGAG CATGCCTGTT  
 PB 4380 .....  
 PB 4381 .....  
 FO 31767 .....  
 PB 3275 .....  
 PB 1828 .....  
 PB 4153 .....  
 FO 31778 .....  
 PB 3385 .....

PB 5634 TGAGTGTCTT GAATATCTCT GCTCC-TCA- ATTTTTTAAC -AAAGATTGG TTTGGAG-CA  
 PB 4380 .....  
 PB 4381 ..... A..... T T.-..... T-..  
 FO 31767 ..... A..... T T.-..... T-..  
 PB 3275 ...A..... -TT.T-T ..... -AA -AAC...T..  
 PB 1828 ...A..... -.T.T T.....T T.-.--AA .AAC...T..  
 PB 4153 ...A..... C...-T.T.T G.....T T.-.-.-A .AAC...T.G  
 FO 31778 ...A..... C...-T.T.T G.....T T.-.-.-A .AAC...T.G  
 PB 3385 ..... TT.T.T T..... G.....-AA -AAC...T..

PB 5634 GGTCCTTGGG CTGCTTGCG GTTT-GTTAC -GAACA--CA AGCTTGCCTT AAATGCATTA  
 PB 4380 .....  
 PB 4381 ..... TA..... T.....  
 FO 31767 ..... TA..... T.....  
 PB 3275 ..... C..... G..... A..... A.....  
 PB 1828 ..... C..... G..... A..... A.....  
 PB 4153 ..... TC..... A..... A..... A.....  
 FO 31778 ..... TC..... A..... A..... A.....  
 PB 3385 ..... TC..... A..... A..... A.....

PB 5634 GCTGGATTTC AGTAGAGTTG TTAAGTAACA TTGAAAAC TC  
 PB 4380 .....  
 PB 4381 .....  
 FO 31767 .....  
 PB 3275 .....GC... C..... G.A... C...C  
 PB 1828 .....AGC... C..... T...G.A...CT...C  
 PB 4153 .....C... C..... TTG...T...T  
 FO 31778 .....C... C..... TTG...T...T  
 PB 3385 ..... G...A...T

PB 5634 TCTAACCCG- CT-G-C---T TTT-TC--A- GTAAAGCACA CATATTCATT TCTTTGGCCT  
 PB 4380 .....  
 PB 4381 ..... T.TGA... T.GG.A A.C.TT...  
 FO 31767 ..... T.TGA... T.GG.A A.C.TT...  
 PB 3275 .....T---. C.T...C ...A.-G-. -C---. -A .....  
 PB 1828 .....T---. T.T.T.GTC ...TGTGG.C .AC---. T---.A .....  
 PB 4153 .....-... A-T...TC .....G... -T---.T T---.A .....  
 FO 31778 .....-... A-T...TC .....G... -T---.T T---.A .....  
 PB 3385 .....T.A.A ..A.T.TTG ..GA-.TATC TA.T---.T T---.A .....

PB 5634 CAAATCAGGT AGGACTACCC GCTGAACTTA Agcatatcaa taagcggagg a  
 PB 4380 .....  
 PB 4381 .....  
 FO 31767 .....  
 PB 3275 .....  
 PB 1828 .....  
 PB 4153 .....  
 FO 31778 .....K.  
 PB 3385 .....

**Alignment 2:**

RBF 1008 ggaagtaaaa gtcgtaacaa ggTTTCTGTA GGTGAACCTG CAGAAGGATC ATTAGTGAAT  
 PB 383 .....  
 PB 2857e .A..... .T.....

RBF 1008 -ACACCGGGG AACCCACTCT GTGGGCCCCA A-CCCTTCA- CCATATCCTC ACACCTGTGC  
 PB 383 .....  
 PB 2857e A...-..... TT.....A. ....C.....C .....A. ....

RBF 1008 ACCGCTGGTA GATG-CCGCT GTACTTCGGT ACGGTTTGCA GCTGCTGGCA A-CC--TATA  
 PB 383 .....  
 PB 2857e .....A.- ..C.G...-- A...GCAA.. -TC..GT.T ...A..A... .C..TT.T..

RBF 1008 CACACACAC- CTGAGTTCTA TGAATGTTAA TTTTACTTGC CTTCGGGCAG AACTAAAATA  
 PB 383 .....  
 PB 2857e ....T...A .AA.-.AA. ....C.C .G.A.-.-A -G.AA.T.. .AC.....

RBF 1008 CAACTTTTGA CAACGGATCT CTGGTTCTC CCATCGATGA AGAACGCAGC GAAATGCGAT  
 PB 383 .....  
 PB 2857e .....

RBF 1008 AAGTAATGTG AATTGCAGAA TTCAGTGAAT CATCGAATCT TTGAACGCAC CTTGCGCTCG  
 PB 383 .....  
 PB 2857e .....C

RBF 1008 TTGGTATTCC GACGAGCATG CCTGTTTGAG TGTCATGAAT TCTCCACCCC C-ATGTCTTT  
 PB 383 .....  
 PB 2857e .....G..... .A...T .A...-.-.

RBF 1008 TGTCACCAAA GGACGTGCTT GGGCGGGTC CAT-GG-GCA T-CT-TTGCC AGTC-TTCGG  
 PB 383 .....  
 PB 2857e .-.TT--- -.TGT..... .TT.... .T.G..T..T .G..G...-- .-.AC...-

RBF 1008 ACAGGCTTGC CTTAAAAGTA TTAGCTGGA- CTGCATCTGC GATGCATTGG TTCTACTCAA  
 PB 383 .....  
 PB 2857e ...-...CA. .C...T... .....C .C.T.CA.A. A...TG.A.. -CG.C.....

RBF 1008 CGTGATAAGT TCATTTCGTTG AGGACGGC-T TC-ACGGCCG GCCAAGCTAC AATGCGATCA  
 PB 383 .....  
 PB 2857e .....AG .....-....AG G.A..T...- -.T.C..T. C.--.TA..

RBF 1008 ATAGTCTGCT TCTAACCCGG CG-CGGAGTG CCTGCACTCC AACCCA--AC TTAACGCTCT  
 PB 383 .....  
 PB 2857e TGT..... .T.... .AAA..C.C TT...G..T G....TG.. ....A.....

RBF 1008 GGCCTCAAAT CAGGTAGGAT TACCCGCTGA ACTTAAgcat atcaataagc ggagga  
 PB 383 .....  
 PB 2857e .....

**RBF 726:**

RBF 726 ggaagtaaaa gtcgtaacaa ggTATCTGTA GGTGAACCTG CAGATGGATC ATTTTGATGA  
RBF 726 AAAACCTTTT TTTTCTGAGG TGTGGCTCGC ACCTGTCCAA CTAAACCTGA GCTACCTTTT  
RBF 726 TTATATAACA CGGTTGCATC GGTCTGGTCTG TCGAAACCAG TAGCGCTCAT AGCGAGCAGC  
RBF 726 GTCCTGGGGAA AGACGGGTCG GCGCTTCTTA CCAACACTTT TGAACACTAG GATTGGAAGG  
RBF 726 ACAAAAATCA TTTTTTTGAT GATGGAAGCG ACTGGTAATG CGGTCGTCTA AATTGAAAAA  
RBF 726 ACAACCTTTG GCAACGGATC TCTTGGTTCT CCCATCGATG AAGAACGCAG CGAATTGCGA  
RBF 726 TAAGTAATGT GAATTGCAGA AGTGAATCAT CGAATCTTTG AACGCACCTT GCGCTCCCGG  
RBF 726 CAGATTTAAT CTGGGGAGCA TGCCTGTTTG AGGGCCGCGA ATTGTTTCGA ACGACAGCTT  
RBF 726 TTTTTTCTTG TTGAGAAAGA GCTGGCGGAT CGGTAGTGAG GGTCTCTGCC ATTTACCGTG  
RBF 726 GCTCCCTCGA AATGCATTAG CGCATCCATT GGAAGGCGGA AAGACGGACG AAAGCTCGAG  
RBF 726 TTTTTTTGCC CTCGCTTCCC TGCCGGGTTT TGATAATGTC AGGACTTCGG AGGCGAAGAG  
RBF 726 AGGGCGGGAG CTGGACGCAA CGACTTTTCT GCTGTTTGGC GTGCTTCTGA ACCCCGCCCA  
RBF 726 TGCCCTGCT TTAACCACAG AGGAAGGGAT TTATTTTTCA ATTCAATCGGC CTCAGATTGG  
RBF 726 TAGGACTACC CGCTGAACTT AAgcatatca ataagcggag ga



## Danksagung

Herrn Prof. Dr. P. BLANZ danke ich für die Anregung zur Beschäftigung mit einer interessanten Pilzgruppe, zu deren Bearbeitung er auch die Kulturen zur Verfügung stellte, und die Einführung in die Grundlagen der Molekularsystematik. Besonders möchte ich mich bei ihm auch für sein anhaltendes Interesse an dieser Arbeit bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. U. JENSSEN, dem früheren Leiter des Lehrstuhls Pflanzensystematik, bei allen Teilnehmern des Grakos „Pflanzen-Herbivoren-Systeme“, bei dessen Leiter Herrn Prof. Dr. E. BECK und bei meinem Grako-Mitbetreuer Herrn Prof. Dr. E. KOMOR habe ich mich für den motivierenden und fördernden Rahmen zu bedanken, in dem diese Arbeit begonnen werden konnte sowie für die Unterstützung in der Anfangsphase meines Promotionsstudiums. Besonderen Dank für die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten am Lehrstuhl auch während bzw. nach dem Wechsel der Lehrstuhlleitung schulde ich Herrn Prof. Dr. U. MAIER und Frau Prof. Dr. S. LIEDE-SCHUMANN.

Die Gel-Dokumentation und Auswertung mit dem Programm CAM konnte freundlicherweise am Lehrstuhl Genetik (Prof. Dr. W. KLINGMÜLLER) durchgeführt werden. Am Lehrstuhl Tierökologie (Prof. Dr. H. ZWÖLFER) wurde mir die Möglichkeit eingeräumt, das Programm NTSYS-pc auf einem ihrer Lehrstuhlrechner installieren und diesen für einige Zeit zur Datenauswertung nutzen zu können. Für eine fundierte Einführung in NTSYS-pc und ihre Hilfestellung bei auftretenden Problemen sei Frau Dr. ANDREA FREESE herzlich gedankt.

PCR-Produkte einiger ITS-Amplifikate wurden am Botanischen Institut der Karl-Franzens-Universität Graz in Zusammenarbeit mit Frau B. SPREITZER sequenziert. Dafür gilt ihr mein Dank und Herr Prof. Dr. T. FRIEDL dafür, daß er CY5-gelabelte Primer für Sequenzierungen am ALFexpress zur Verfügung stellte. 26S rDNA-Sequenzen von Exobasidien wurden von Frau E. STEVANEČZ in ihrer Diplomarbeit an der Universität Graz unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. P. BLANZ angefertigt, von denen einige freundlicherweise in die Auswertungen dieser Arbeit einfließen konnten.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei allen Angehörigen des Lehrstuhls Pflanzensystematik, den wissenschaftlichen Mitarbeitern, den Doktoranden und Diplomanden, den TAs, der Sekretärin. Auch wenn nicht alle einzeln hier aufgeführt werden können, zum Gelingen dieser Arbeit haben sie in der ein oder anderen Form beigetragen. Egal ob mit Hilfestellungen bei kleineren oder auch größeren Problemen des Labor- und Computeralltags und organisatorischen Dingen oder aber durch vielfältige, häufig sehr anregende Gespräche und durchaus auch kritische Diskussionen - dies und mehr schufen eine angenehme Arbeitsatmosphäre und machten das Doktorandenleben am Lehrstuhl zu dem, was es war. An dieser Stelle seien aber Frau Dr. HILDE FISCHER, Frau Dr. BIRGIT DANK und Frau Dr. ALEXANDRA WOLFRUM namentlich genannt, die mich durch Ihre Gesprächsbereitschaft, konstruktive Ratschläge und das Korrekturlesen bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützten - vielen herzlichen Dank.

Missen möchte ich auch keinesfalls die wissenschaftliche Mitarbeit in anderweitigen Forschungsprojekten während meiner Promotionszeit. Frau Dr. SONJA SELENSKA-POBELL (Dresden), Frau Dr. DAGMAR TRIEBEL (München) und Herrn Dr. MATS WEDIN (Umeå, Schweden) möchte ich hier daher für die vielfältigen Möglichkeiten zu äußerst motivierender und vielfältiger wissenschaftlicher Arbeit danken, aber auch für Ihr Interesse an meiner Promotionsarbeit.

Meinen Eltern, meiner Schwester und ihrer Familie, sowie den Freunden, die mich auch im Zusammenhang mit meiner Promotion freundschaftlich-familiär unterstützten (und die wohl wissen, wer gemeint ist), gilt mein abschließender Dank, da auch sie in vielfältiger Form zur Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit beitrugen.



## Wissenschaftlicher Lebenslauf

Heidi Döring, geboren am 11.12.1964 in Kassel

### Schulbildung und Studium

1983 Abiturprüfung an der Jacob-Grimm-Schule, Gymnasium in Kassel

WS 1983/84 Beginn des Biologie-Studiums an der Philipps-Universität Marburg/Lahn. Hauptfach Botanik (Frau Prof. Dr. HENSSEN). Nebenfächer Zoologie (Prof. Dr. SEITZ), Geographie (Prof. Dr. DONGUS) und Ökologie (Prof. Dr. REMMERT). Zusatzfach Evolution und Systematik der höheren Pflanzen (Frau Prof. Dr. LENSKI). Studienschwerpunkte: Spezielle Botanik, Mykologie und Lichenologie. Diplomarbeit bei Frau Prof. Dr. HENSSEN: „Morphologisch-ontogenetische Studien an australasiatischen Flechten“. Diplomabschluß am 30.6.1990

Promotionsstudium an der Universität Bayreuth, am Lehrstuhl für Pflanzensystematik seit WS 1990/91

### Wissenschaftliche Berufstätigkeit und Forschungsstipendien

- 1990-1993 Mitglied des Graduiertenkollegs „Pflanzen-Herbivoren-Systeme“ an der Universität Bayreuth
- 1995/1996 Wiss. Mitarbeiterin bei Dr. S. SELENSKA-POBELL, Lehrstuhl für Genetik, Universität Bayreuth in dem Projekt „Schnelle Identifizierung von Rhizobien auf der Basis der RFLP-Analyse von 23S-rDNA-Amplifikaten“
- Nov./Dez.1996 Wiss. Mitarbeiterin bei Dr. S. SELENSKA-POBELL, Forschungszentrum Rossendorf/TU Dresden
- März/April1997 Wiss. Mitarbeiterin bei Dr. D. TRIEBEL an der Botanischen Staatssammlung München in dem Projekt „Leotiales“
- September1997 Forschungsaufenthalt am Natural History Museum London - FEMS-Stipendium der British Mycological Society
- 1998/1999 Research Assistant am Natural History Museum London, Department of Botany bei Dr. M. WEDIN
- Juli+Nov. 1999 Forschungsaufenthalt am Natural History Museum London - Travel Grant der British Lichen Society
- seit 2002 Guest Researcher, Institutionen för ekologi och geovetenskap, Umeå Universitet, Schweden

### Wissenschaftliche Veröffentlichungen

- HENSSEN, A., H. DÖRING & G. KANTVILAS (1992) *Austropeltum glareosum* gen. et sp. nov., a new lichen from mountain plateaux in Tasmania and New Zealand. *Bot. Acta* **105**: 395-468.
- BLANZ, P. & H. DÖRING (1995) Taxonomic relationships in the genus *Exobasidium* (Basidiomycetes) based on ribosomal DNA analysis. *Stud. Mycol.* **38**: 119-127.
- SELENSKA-POBELL, S., H. DÖRING & E. EVGUENIEVA-HACKENBERG (1997) Unusual organization of the 23S rRNA genes in Rhizobiaceae. *Soil Biol. Biochem.* **29**: 905-909.
- DÖRING, H. & H. T. LUMBSCH (1998) Ascoma ontogeny: Is this character set of any use in the systematics of lichenized ascomycetes? *Lichenologist* **30**: 489-500.
- DÖRING, H. & D. TRIEBEL (1998) Phylogenetic relationships of *Bulgaria* inferred by 18S rDNA sequence analysis. *Cryptogam. Bryol. Lichénol.* **19**: 123-136.
- SELENSKA-POBELL, S. & H. DÖRING (1998) Sequences around the fragmentation sites of the

- large subunit ribosomal RNA in the family Rhizobiaceae. *Antonie Leeuwenhoek* **73**: 55-67.
- DÖRING, H., A. HENSSEN & M. WEDIN (1999) Ascoma development in *Neophyllis melacarpa* (Lecanorales, Ascomycota), with notes on the systematic position of the genus. *Aust. J. Bot.* **47**: 783-794.
- WEDIN, M. & H. DÖRING (1999) The phylogenetic relationship of the Sphaerophoraceae, *Austropeltum* and *Neophyllis* (lichenized Ascomycota) inferred by SSU rDNA sequences. *Mycol. Res.* **103**: 1131-1137.
- WEDIN, M., H. DÖRING & J.-E. MATTSSON (1999) A multi-gene study of the phylogenetic relationships of the Parmeliaceae. *Mycol. Res.* **103**: 1185-1192.
- DÖRING, H. & P. BLANZ (2000) 18S rDNA-Analysen bei der Gattung *Exobasidium*. *Hoppea* **61**: 85-100.
- DÖRING, H. & M. WEDIN (2000) Homology assessment of the boundary tissue in fruiting bodies of the lichen family Sphaerophoraceae (Lecanorales, Ascomycota). *Plant Biol.* **2**: 361-367.
- DÖRING, H., P. CLERC, M. GRUBE & M. WEDIN (2000) Mycobiont-specific PCR primers for the amplification of nuclear ITS and LSU rDNA from lichenized ascomycetes. *Lichenologist* **32**: 200-204.
- KASALICKY, T., H. DÖRING, G. RAMBOLD & M. WEDIN (2000) A comparison of ITS and LSU nrDNA phylogenies of *Fulgensia* (Teloschistaceae, Lecanorales), a genus of lichenised ascomycetes. *Can. J. Bot.* **78**: 1580-1589.
- WEDIN, M., H. DÖRING & S. EKMAN (2000) Molecular phylogeny of the lichen families Cladoniaceae, Sphaerophoraceae, and Stereocaulaceae (Lecanorales, Ascomycotina). *Lichenologist* **32**: 171-187.
- WEDIN, M., H. DÖRING, A. NORDIN & L. TIBELL (2000) Small subunit rDNA phylogeny shows the lichen families Caliciaceae and Physciaceae (Lecanorales, Ascomycotina) to form a monophyletic group. *Can. J. Bot.* **78**: 246-254.
- LUMBSCH, H. T., I. SCHMITT, H. DÖRING & M. WEDIN (2001) Molecular systematics supports the recognition of an additional order of the Ascomycota: the Agyriales. *Mycol. Res.* **105**: 16-23.
- LUMBSCH, H. T., I. SCHMITT, H. DÖRING & M. WEDIN (2001) ITS sequence data suggest variability of ascus types and support ontogenetic characters as phylogenetic discriminators in the Agyriales (Ascomycota). *Mycol. Res.* **105**: 265-274.
- SQUARTINI, A., P. STRUFFI, H. DÖRING, S. SELENSKA-POBELL, E. TOLA, A. GIACOMINI, E. VENDRAMIN, P. F. VELÁZQUEZ, E. MARTÍNEZ-MOLINA, F. B. DAZZO, S. CASELLA & M. P. NUTI (2002) *Rhizobium sullae* sp. nov. (formerly *Rhizobium hedysari*), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 1267-1276.

### Tagungspräsentationen - Vorträge

- DÖRING, H. „RFLP-Analysen bei Arten der Gattung *Exobasidium*“ 1994 Tagung der Gesellschaft für Mykologie und Lichenologie, Braunschweig
- DÖRING, H., R. BRANDL & P. BLANZ „Host specificity in the parasite/host system *Exobasidium* (Basidiomycetes) and Ericaceae as based on molecular data“ 1994 Inter. Congress of Mycology Division, Inter. Union of Microbiological Societies Congresses, Prag
- BLANZ, P. & H. DÖRING „Ribosomal RNA analysis as a tool to characterize taxonomic relationships in the genus *Exobaosidium* (Basidiomycetes)“ 1994 Inter. Mycological Congress, Vancouver
- SELENSKA-POBELL, S. & H. DÖRING „Inter- and intraspecies diversities in the family Rhizo-

- biaceae“ 1996 Fifth Symposium on Bacterial Genetics and Ecology, Nafplion
- DÖRING, H. & D. TRIEBEL „Untersuchungen zur Phylogenie der Gattung *Bulgaria* (Ascomycetes)“ 1997 Tagung der Gesellschaft für Mykologie und Lichenologie, Regensburg
- DÖRING, H. & H. T. LUMBSCH „Ascoma ontogeny in lichen systematics“ 1998 Symposium on Taxonomy, Evolution and Classification of Lichens and Related Fungi, The Linnean Society of London/The British Lichen Society/The Systematics Association, London
- DÖRING, H. & M. WEDIN „Ascoma ontogeny within Lecanorales *subord.* Cladoniineae, as shown by anatomical studies and analyses of molecular phylogeny“ 1998 Workshop ‚Progress in Molecular Studies of Lichens‘, Graz
- DÖRING, H. & M. WEDIN „Homology assessment of the boundary tissue in fruiting bodies of the lichen family Sphaerophoraceae“ 2000 The Fourth IAL Symposium, Barcelona

### Tagungspräsentationen - Poster

- DÖRING, H. „Wirtsspezifität bei phytopathogenen Pilzen“ 1991 Tagung der Sektion Mykologie der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Bayreuth
- DÖRING, H. „Developmental morphology of *Neophyllis pachyphylla* (Müll.Arg.) G.Schneider <synonym: *Neophyllis melacarpa* (F.Wils.) F.Wils.>“ 1992 Second Inter. Lichenological Symposium, Båstad
- DÖRING, H. & P. BLANZ „RFLP-Analysen in der Gattung *Exobasidium* (Basidiomycetes): PCR-Fingerprinting“ 1993 Tagung ‚Molekularbiologie der Pilze‘, Institut für Genbiologische Forschung Berlin GmbH, Berlin
- DÖRING, H. „PCR-Fingerprinting zur Charakterisierung von Stämmen in der Gattung *Exobasidium*“ 1994 Tagung der Gesellschaft für Mykologie und Lichenologie, Braunschweig
- BLANZ, P. & H. DÖRING „Molekulare Taxonomie mittels DNA-Untersuchungen am Beispiel der pflanzenpathogenen Pilzgattung *Exobasidium*“ 1994 Gemeinsame Jahrestagung Österreichische Biochemische Gesellschaft und Österreichische Gesellschaft für Genetik und Gentechnik, Salzburg
- SELENSKA-POBELL, S., E. EVGUENIEVA-HACKENBERG, H. DÖRING & P. VAN BERKUM „Unusual organization of the 23S rRNA genes in Rhizobiaceae“ 1995 Inter. Symposium ‚Sustainable Agriculture for the tropics: The role of biological nitrogen fixation‘, Rio de Janeiro
- DÖRING, H., E. EVGUENIEVA-HACKENBERG & S. SELENSKA-POBELL „Organization and processing of 23S rRNA genes in Rhizobiaceae“ 1996 VAAM-Frühjahrstagung, Bayreuth
- DÖRING, H. & P. BLANZ „Introns in der 26S rDNA von Stämmen der Gattung *Exobasidium* (Basidiomycetes)“ 1996 Botanikertagung, Deutsche Botanische Gesellschaft und Vereinigung für Angewandte Botanik, Düsseldorf
- DÖRING, H. & P. BLANZ „DNA sequence comparison of internal transcribed spacers in rDNA tandem repeats in the parasitic fungal genus *Exobasidium*“ 1997 Gemeinsame Jahrestagung Österreichische Biochemische Gesellschaft und Österreichische Gesellschaft für Genetik und Gentechnik, Wien
- STEVANECZ, E., H. DÖRING, B. SPREITZER & P. BLANZ „Gruppe-I-Introns im 26S rRNA-Gen von *Exobasidium* (Basidiomycetes)“ 1997 Tagung der Gesellschaft für Mykologie und Lichenologie, Regensburg
- WEDIN, M. & H. DÖRING „Lichen systematics at the Natural History Museum“ 1998 The Linnean Society ‚110. Anniversary of the first Conversazione‘, London
- DÖRING, H., P. CLERC, M. GRUBE & M. WEDIN „Mycobiont-specific primers for PCR amplification of nuclear LSU rDNA and ITS from lichenised ascomycetes“ 1999 Tagung der Gesellschaft für Mykologie und Lichenologie, Tübingen



## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich anderweitig mit oder ohne Erfolg nicht versucht habe, diese Dissertation einzureichen. Ich habe keine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden.

Bayreuth, den 8.12.2003

A handwritten signature in black ink on a light background. The signature reads "Heidi Döring" in a cursive script. The "H" is tall and thin, the "i" has a dot, and the "D" is large and loops around. The "r" is thin and vertical, and the "ing" is written in a fluid, connected style. A long horizontal stroke extends from the end of the signature.

