

Neu charakterisierte Pathogenitäts-korrelierte Gene eignen sich im PCR-Test für eine weitergehende Differenzierung von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Isolaten aus der JKI-Stammsammlung

Newly characterized pathogenicity-correlated genes are suitable in a PCR-test for a further differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-isolates from the JKI strain collection

278

Zusammenfassung

Am Beispiel von *Fusarium oxysporum* forma specialis (f. sp.) *lycopersici* aus der JKI-Stammsammlung wurde das Vorkommen des Pathogenitäts-korrelierten, bedingt überzähligen (conditional dispensable, CD) Chromosoms mittels PCR untersucht. So ließ sich nur bei *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* das Vorhandensein des CD-Chromosoms mit der PCR nachweisen, während bei der nahe verwandten f. sp. *radicis-lycopersici* dieses Chromosom fehlte.

Die These einer stattgefundenen Übertragung des CD-Chromosoms auf verschiedene klonale Linien von *F. oxysporum* wurde durch die Verwendung von teilspezifischen Primern zur Untersuchung des chromosomalen „Hintergrunds“ der einzelnen *Fusarium oxysporum*-Isolate getestet. Bei zehn in der JKI-Stammsammlung vorhandenen *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Isolaten ließen sich deutlich zwei verschiedene chromosomale „Hintergründe“ mit insgesamt drei verwendeten teilspezifischen Primerpaaren nachweisen. Mit diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine Polyphyletie bei *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* vorliegt, es also zwei verschiedene *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Linien in der JKI-Stammsammlung gibt, die dieses CD-Chromosom besitzen. Polyphyletische Studien könnten zukünftig als zusätzliches Kriterium zur Einordnung von *Fusarium*-Isolaten verwendet werden.

Stichwörter: JKI-Stammsammlung, *Fusarium oxysporum* forma specialis *lycopersici*, bedingt überzähliges (conditional dispensable) Chromosom, PCR-Test, polyphyletische Isolate

Abstract

Fusarium oxysporum forma specialis (f. sp.) *lycopersici* was evaluated as an example from the JKI strain collection to detect the occurrence of the pathogenicity-correlated conditional dispensable (CD) chromosome via PCR. Only in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* the CD-chromosome could be detected, while it was not detected in the closely related *F. sp. radicis-lycopersici*.

The theory of a transfer of the CD-chromosome into different clonal lines of *F. oxysporum* was tested by the application of partly-specific primers to investigate the chromosomal background of each isolate. Ten conserved *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolates of the JKI strain collection were clearly differentiated into two chromosomal categories, when three partly-specific primer pairs were applied. With these experiments it could be shown that *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* was polyphyletic, i. e. there are two different *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* lines in the JKI strain collection possessing the CD chromosome. In future, polyphyl-

Institut

Julius Kühn-Institut – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Braunschweig

Kontaktanschrift

PD Dr. Frank Niepold, Julius Kühn-Institut – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig, E-Mail: frank.niepold@jki.bund.de

Zur Veröffentlichung angenommen

Februar 2009

etic studies could be used as an additional criterion for the classification of *Fusarium* isolates.

Key words: JKI strain collection, *Fusarium oxysporum* forma specialis *lycopersici*, conditional dispensable chromosome, PCR-test, polyphyletic isolates

Einleitung

In der JKI-eigenen Mikroorganismen-Stammsammlung befinden sich zurzeit 2571 *Fusarium*-Stämme, die für wissenschaftliche Versuche zur Verfügung gestellt werden können. Einzelheiten über sämtliche Isolate der JKI-Stammsammlung können unter der E-Mail Adresse frank.niepold@jki.bund.de erfragt werden. Exemplarisch sollten aus der JKI-Stammsammlung die als Tomatenpathogene identifizierten *Fusarium oxysporum*-Isolate unter dem Aspekt von kürzlich charakterisierten Pathogenitäts-korrelierten Genen mittels PCR untersucht werden.

Nach wie vor besteht eine besondere Herausforderung an das phytopathologische Verständnis der Pathogenitätsmechanismen bei der Gruppe der *Fusarium oxysporum*-Isolate. Bei diesen Pilzen gibt es keine sexuelle Vermehrung und somit existiert nur seine anamorphe Form. Diese meist im Boden vorkommende Pilzart bildet mit anderen dort vergesellschafteten Mikroorganismen ein komplexes Netzwerk und zeichnet sich in erster Linie durch ihre saprophytische Lebensweise aus. Findet *F. oxysporum* allerdings seine Wirtspflanze vor, kann der Pilz dort infizieren und Wurzelkrankheiten verursachen. Im späteren Verlauf kommt es durch eine weitere Besiedlung der Wirtspflanze zur Verstopfung der Leitbündel (MANDEEL et al., 1994), was dann auch zu Vergilbungen des Sprosses und der Blätter infolge einer Welktoxinebildung (DIMOND, 1970) führen kann. Da *F. oxysporum* für gewöhnlich nur eine oder wenige Pflanzenspezies infiziert, wird der Pilz deshalb in „formae speciales“ gruppiert (GORDON und MARTYN, 1997). Warum der Pilz auf der einen Seite ein Pathogen für eine Pflanzenart und auf der anderen ein harmloser Saprophyt oder sogar ein der Pflanzengesundheit zuträglicher Pilz sein kann, ist nach wie vor ungeklärt (RECORBET et al., 2003).

Bedingt durch seine Asexualität kann *F. oxysporum* nur begrenzt genetische Informationen austauschen. Allerdings ist bei *F. oxysporum* eine Vielzahl von „vegetativ kompatiblen Gruppen“ bekannt. Unter vegetativer Kompatibilität versteht man nach CORELL et al. (1987) die Fähigkeit, nach einer Anastomose (Hyphenfusion) stabile Heterokaryonten (mehrkernige Zellen) zu bilden. Durch den Mechanismus der Anastomose kann eine vegetativ kompatible Gruppe durchaus polyphyletisch sein, d. h. es kann Isolate mit gleicher Fähigkeit (z. B. Pathogenität an Tomaten) geben, die aus mehr als nur einer einzigen Abstammung hervorgegangen sind. Die Möglichkeit einer Polyphylie wurde schon von O`DONNELL et al. (1998) bei den formae speciales *cutubense*, *gladioli* und auch bei *lycopersici* vermutet.

Bei *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ließ sich ein so genanntes „bedingt überzähliges Chromosom (conditional

dispensable [CD] chromosome)“ auffinden, das sich als ein stabiler Pathogenitätsfaktor bei Isolaten der f. sp. *lycopersici* gezeigt hat (VAN DER DOES et al. 2008). So waren alle *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Isolate, die dieses CD-Chromosom enthielten, in der Lage, nach ihrer Infektion in Tomatenpflanzen kleine, Pathogenitäts-korrelierte Proteine auszuschleiden (REP et al., 2005). Nach Untersuchungen der Arbeitsgruppe von VAN DER DOES (2008) soll das Vorhandensein des CD-Chromosoms deshalb ein wesentliches Kriterium zur Unterscheidung der f. sp. *lycopersici* von anderen formae speciales sein. Um das zu testen wurden die in der JKI-Stammsammlung befindlichen *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* verwendet. Als Kontrolle dienten die *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*-Isolate, da bei dieser forma specialis sich das CD-Chromosom nicht nachweisen lassen sollte.

Nach der Polyphylie-Hypothese ist bei *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Isolaten anzunehmen, dass das CD-Chromosom, wahrscheinlich durch horizontalen Gentransfer (VAN DER DOES et al., 2008), in verschiedene klonale bzw. unterschiedliche Linien von *F. oxysporum* gelangt sein könnte. Dass ein horizontaler Gentransfer keineswegs ein ungewöhnlicher Mechanismus in der Natur ist und wohl auch bereits mehrmals bei pflanzenpathogenen Pilzen stattgefunden hat, konnte in einem Übersichtsartikel von SOANES et al. (2007) gezeigt werden. Dort sind die bislang anhand von Sequenzierungsdaten bekannten horizontalen Gentransfers von Pathogenitäts-korrelierten Genen bei pflanzenpathogenen Pilzen beschrieben.

Um diesen horizontalen Gentransfer von Pathogenitäts-korrelierten Genen bei *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* zu zeigen, wurde die chromosomale DNA oder der „genetische Hintergrund“ der einzelnen Isolate aus der JKI-Stammsammlung auf das mögliche Vorkommen einer Polyphylie untersucht. Nach der Hypothese von VAN DER DOES et al. (2008) sollten polyphyletische *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Isolate über die Zeit an verschiedene *F. oxysporum*-Linien weitergegeben worden sein, was an einem veränderten „genetischen Hintergrund“ der einzelnen Isolate erkennbar sein sollte. Da die Stammsammlung des JKI über eine Anzahl von verschiedenen *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Isolaten verfügt, die auch zu unterschiedlichen Zeitpunkten und an verschiedenen Orten isoliert wurden, konnte die These eines Transfers des CD-Chromosoms in verschiedene „genetische Hintergründe“ von *F. oxysporum* mittels PCR und Primer untermauert werden.

Material und Methoden

F. oxysporum f. sp.-Isolate und DNA-Extraktion

Die für die Versuche verwendeten *F. oxysporum* f. sp.-Isolate wurden der JKI-eigenen Stammsammlung entnommen. Die dabei verwendeten Isolate und deren Herkunft sind aus Tab. 1 ersichtlich.

Die Anzucht der Fusarien erfolgte auf SNA-Minimalagar (NIRENBERG, 1976), und zur DNA-Extraktion wurde das auf Agarplatten gewachsene Luftmyzel geerntet. Eine

Tab. 1. Die zur Untersuchung verwendeten *Fusarium oxysporum*-Isolate aus der JKI-Stammsammlung. *F. oxy. lycopersici* = *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*; *F. oxy. radialis-lyco* = *Fusarium oxysporum* f. sp. *radialis-lycopersici*. Die Nummerierung entspricht derjenigen, die in den Abbildungen verwendet wurde

Nummer	JKI Stamm	forma specialis	Herkunft	Isolierung
1*	62059	<i>F. oxy. lycopersici</i>	NL	1968
2	62337	<i>F. oxy. lycopersici</i>	De	1960
3	62338	<i>F. oxy. lycopersici</i>	I	1969
4	72337	<i>F. oxy. lycopersici</i>	F	2004
5*	72338	<i>F. oxy. lycopersici</i>	USA	2003
6	72339	<i>F. oxy. lycopersici</i>	F	2003
7	72340	<i>F. oxy. lycopersici</i>	USA	2003
8	72362	<i>F. oxy. lycopersici</i>	USA	2004
9	72363	<i>F. oxy. lycopersici</i>	USA	2004
10	72364	<i>F. oxy. lycopersici</i>	USA	2004
11#	62060	<i>F. oxy. „lycopersici“</i>	USA	1970
A	69025	<i>F. oxy. radialis-lyco</i>	A	1994
B	72472	<i>F. oxy. radialis-lyco</i>	De	2004
C	72204	<i>F. oxy. radialis-lyco</i>	NL	2003

* Zweite klonale *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Linie

Kein CD-Chromosom nachweisbar

DNA-Extraktion wurde nach der CTAB-Methode durchgeführt (DAY und SHATTOCK, 1997).

Durchführung der PCR

Zum PCR-Nachweis des CD-Chromosoms wurden insgesamt drei Primerpaare verwendet, wobei die beiden Primerpaare P12 f1 (5' ccc cga att gag gtg aag 3') bzw. P12 r1 (5' aat aga gcc tgc aaa gca tg 3') und Six2 f (5' atg ctc tca aaa tgc cgt tg 3') und Six2r (5' tca aca tag gcc aca cca tt 3') aus der Literatur (VAN DER DOES et al., 2008) stammen und in der 14531 bp *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Teilsequenz des CD-Chromosoms (NCBI Datenbank unter AJ608703 aufrufbar) enthalten sind. Die Primerpaare BestP f (5' gca agt agg tgc gat cgt 3') und BestP r (5' acc aaa ccc tca tta ctc 3') wurden mit dem DNA-Programm „DNA Club“ von Xiongfong Cen als ein geeignetes Primerpaar innerhalb der 14531 bp langen Teilsequenz gewählt. Alle Primer wurden von der Fa. IBA (Göttingen) synthetisiert.

Die Primer zur Untersuchung der Polyphyly von *Fusarium oxysporum* waren wie folgt:

C51 f (5' atg gtg aac tgc tgc tgg c 3') und r (5' ccc ttc tta cgc caa tct cg 3') spezifische Sequenz von *F. culmorum*, NICHOLSON et al. (2004).

IGS f (5' agt gcc ttg ttg cta cga 3') und r (5' tgt ggt atg gcc cca gat 3') Inter-genomischer Spacer der ribosomalen DNA bei *Ganoderma* sp., Diss., UOMO (2002).

FP 82 f (5' caa gca aac agg ctc ttc acc 3') und r (5' tgt tcc acc tca gtg aca ggt t 3') spezifische Sequenz von *F. poae*, NICHOLSON et al. (2004).

Alle PCR-Versuche wurden in je 10 µl-Reaktionsansätzen durchgeführt und erfolgten im Hybaid PCR-Sprint

Thermal Cycler (Fa. Thermo Electron GmbH, Dreieich) mit folgenden Temperaturen und Zeiten: 3 min. 96°C, 50 sec. 95°C, 45 sec 60°C, 50 sec 72°C insgesamt für 45 Zyklen und einer Auffüllreaktion bei 72°C für 5 min. Die Produkte der PCR wurden auf ein 1,4%iges Gel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und nach erfolgter Ethidiumbromidfärbung fotografiert.

Ergebnisse und Diskussion

Nachweis des CD-Chromosoms

Bei Verwendung der Primer P12 f und P12 r sowie BestP f und r zeigten sich bei 10 der 11 insgesamt getesteten *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Isolate PCR-Fragmente in der erwarteten Größe. Diese lagen bei 381 bp (P12 f und r) und bei 477 bp (BestP f und r, Abb. 1A und B). Zur Bestätigung der Ergebnisse der beiden Primerpaare P12 und BestP wurde auch das Primerpaar Six2 f und r verwendet. Auch diese Primer zeigten eine einheitlich 330 bp große DNA-PCR-Bande und bestätigen somit das Ergebnis der beiden anderen Primerpaare (Ergebnisse nicht abgebildet).

Einen speziellen Fall stellte das *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Isolat mit der JKI-Stammsammlungsbezeichnung 62060 dar. Bei diesem Isolat zeigten sich nicht die erwarteten spezifischen Banden, wenn die drei Primer (P12, BestP und Six2) zum Nachweis des Vorhandenseins des CD-Chromosoms verwendet wurden (Abb. 2, Gelbahn Nr. 11). Da das Isolat 62060 wesentlich schlechter auf dem SNA-Minimalagar wuchs als all die anderen getesteten Isolate, könnte es sich beim Isolat 62060 um kein ech-

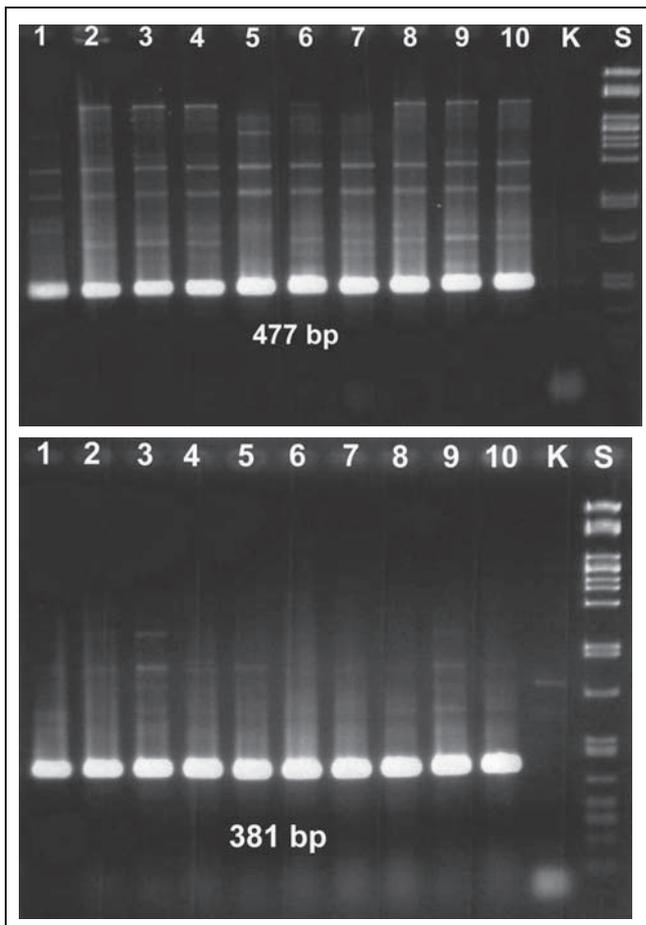


Abb. 1. A (oben) und B (unten). Verwendung der Primerpaare BestP und P12 zum Nachweis des CD-Chromosoms bei *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Die Gelbahn-Nummern 1 bis 10 entsprechen der Reihenfolge der jeweiligen Isolate, wie sie in Tab. 1 aufgelistet sind. Abb. 1 A zeigt das PCR-Produkt des Primerpaars BestP (477 bp) und Abb. 1 B das PCR-Produkt des Primerpaars P12 (381 bp). K ist die Wasser-PCR-Kontrolle und S repräsentiert den Längenstandard der λ DNA, gespalten mit der Restriktionsendonuclease *Pst*I.

tes *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Isolat mehr handeln. Ähnliche Ergebnisse wurden von VAN DER DOES et al. (2008) erzielt, da 5 von insgesamt 77 untersuchten *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Isolaten ebenfalls kein PCR-Signal mit den für das CD-Chromosom spezifischen Primern zeigten. Somit lässt sich der Nachweis des CD-Chromosoms als ein Stammsammlungsspezifisches Kriterium für die Einordnung zukünftiger neuerer oder auch älterer *F. oxysporum* Tomaten-Isolate aus anderen Stammsammlungen verwenden.

Die aus der JKI-Stammsammlung stammenden *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*-Isolate wiesen mit den drei Primern (P12, BestP und Six2) keine distinkten Banden auf, die auf das Vorhandensein des CD-Chromosoms schließen ließen. Exemplarisch ist das Ergebnis mit den Primern P12 in Abb. 2 gezeigt. Dieses Ergebnis zeigt, dass sich die verwendeten spezifischen Primer zum Nachweis der Existenz des CD Chromosoms eignen und somit eine korrekte Einordnung der *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Isolate in der JKI-Stammsammlung vorgelegen hat.

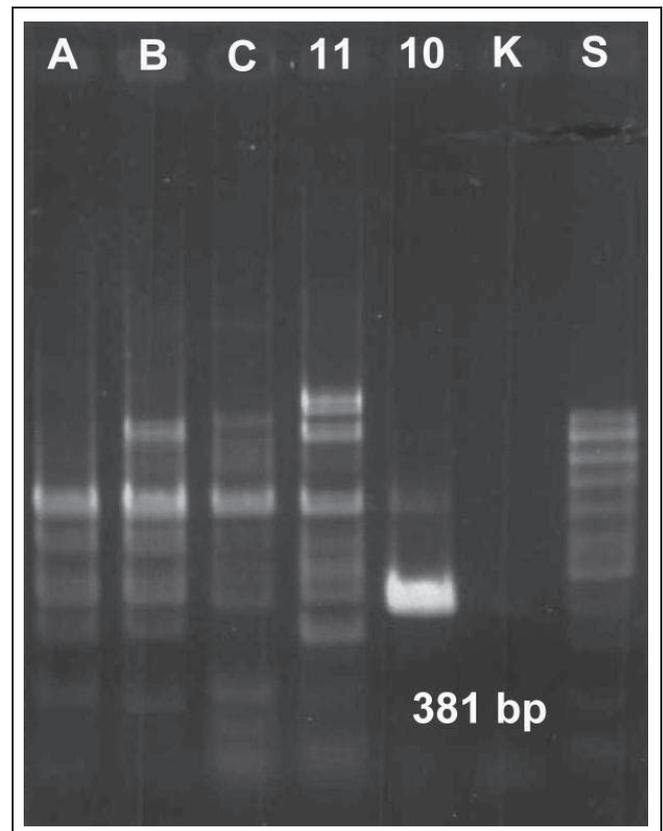


Abb. 2. Untersuchung auf das Vorhandensein des CD-Chromosoms in *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (A-C) mit dem Primerpaar P12. Nur die Kontrolle (Gelbahn Nr. 10, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 72364) zeigte das spezifische 381 bp PCR-Fragment. In den untersuchten *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*-Isolaten war die spezifische DNA-Bande nicht auffindbar. Ebenso ließ sich beim Isolat *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 62060 (Gelbahn Nr. 11) keine 381 bp-spezifische Bande finden. S repräsentiert den 100 bp Standard der Fa. Nextec, Leverkusen.

Differenzierung von genetisch unterschiedlichen *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Typen

Um der Hypothese nachzugehen, ob das CD-Chromosom durch einen horizontalen Gentransfer in unterschiedliche *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Isolate gelangt sein könnte, wurde als Indiz der genetische Hintergrund der einzelnen *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Isolate aus der JKI-Stammsammlung untersucht. Dazu wurden im Bezug auf *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* teilspezifische Primer verwendet, die beispielsweise sowohl bei *F. culmorum* als auch bei *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* vorkommen – also artspezifisch sind – und ein bestimmtes Primerbanden-Muster produzierten. Um eine Erhöhung der Spezifität und Reproduzierbarkeit des Bandenmusters mit diesen Primern in der PCR zu erzielen, wurde eine Annealing-Temperatur von 60°C verwendet. Es ließen sich reproduzierbare DNA-Banden von den einzelnen *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Isolaten erzeugen, wobei die Reproduktivität mehrere Male überprüft wurde. Es zeigte sich, je nach Wahl der Primer, ein unterschiedliches, aber jeweils reproduzierbares Bandenmuster bei den untersuchten *Fusarium*-Isolaten. Beim Primerpaar C51 war eine 980 bp große PCR-Bande bei 8 von 10 getesteten *F.*

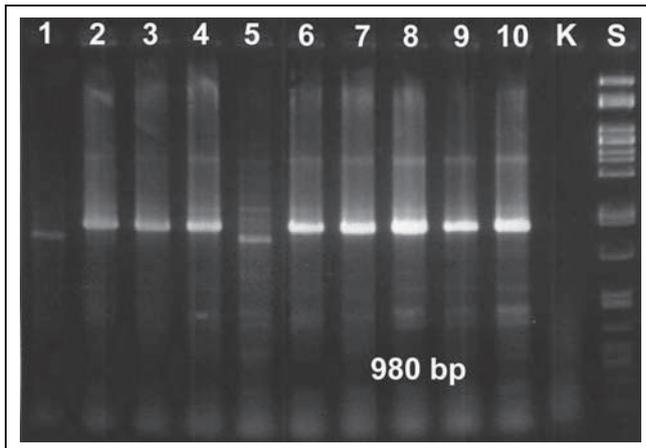


Abb. 3. PCR-Nachweis von verschiedenen chromosomalen Hintergründen einzelner *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Isolate mit dem Primerpaar C51. Deutlich sind insgesamt zwei klonale *Fusarium*-Linien am DNA-Bandenmuster zu unterscheiden (Gelbahn-Nummern 1 bzw. 5 und 2-4 bzw. 6-10). Innerhalb der beiden *Fusarium*-Linien scheint es Homologien zu geben. K ist die Wasser-PCR-Kontrolle und S repräsentiert den Längenstandard der λ DNA, gespalten mit der Restriktionsendonuclease *Pst*I.

oxysporum f. sp. *lycopersici*-Isolaten nachweisbar. Nur die Isolate 72338 (Gelbahn-Nr. 1) und 62059 (Gelbahn-Nr. 5) zeigten reproduzierbar keine Bande bei 980 bp, sondern eine etwas schwächere bei 950 bp (Abb. 3). Wurden die IGS-Primer verwendet, war ebenfalls nur bei den beiden Isolaten 72338 und 62059 eine zusätzliche Bande bei 800 bp sichtbar, und bei Verwendung der Pf82 Primer trat eine Bande mit der Größe von 600 bp ebenfalls nur bei den Isolaten 72338 und 62059 auf (Ergebnisse nicht abgebildet). So wurde bei diesen beiden Isolaten jeweils immer ein anderes Bandenmuster reproduzierbar mit verschiedenen Primern synthetisiert als bei den restlichen acht anderen *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Isolaten. Zufällige Mutationen im Annealing-Bereich der drei verwendeten Primer können deshalb ausgeschlossen werden, da mit allen Primerpaaren jeweils ein konstanter Unterschied der beiden *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Isolate 72338 und 62059 zu den anderen acht Isolaten feststellbar war.

Unabhängig von der Wahl der Primer konnte also regelmäßig festgestellt werden, dass die beiden Isolate 72338 und 62059 zwar untereinander immer im Bandenmuster übereinstimmten, also höchstwahrscheinlich monophyletisch sind, sich jeweils aber immer von den anderen 8 Isolaten unterschieden. Deshalb scheint hier bei den 10 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Isolaten aus der JKI-Stammsammlung eine Polyphyly vorzuliegen in der Form, dass zwei *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* einer klonalen Linie angehören und die anderen acht zu einer zweiten klonalen Linie gehören. Da die beiden Isolate 72338 und 62059 zu verschiedenen Zeitpunkten (1968/2003) und auch an verschiedenen Standorten (USA/NL) isoliert wurden und dennoch ein gleiches PCR-Bandenmuster der chromosomalen DNA zeigten, könnte es sich um koexistierende polyphyliche *Fusarium*-Isolate handeln. Eine praktische Anwendung fanden

die *Fusarium*-teilspezifischen Primer C51 f und r bei den drei in der JKI-Stammsammlung verfügbaren *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Isolaten (69025, 72204 und 72472): bei allen drei Isolaten wurden verschiedene Bandenmuster im „genetischen Hintergrund“ mit diesen Primern gefunden. Ihre „genetischen Hintergründe“ unterschieden sich sowohl untereinander als auch vom Muster der beiden klonalen Linien in den untersuchten *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Isolaten (Ergebnisse nicht gezeigt).

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es mithilfe des pathogenitätskorrelierten CD-Chromosoms möglich geworden ist, genetische Typen von *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Isolaten mit der sogenannten „Hintergrund-DNA“ zu differenzieren. Dadurch ist ein neuer Stammsammlungsspezifischer Aspekt hinzugekommen. Pathogenitätskorrelierte Gene dienen allgemein zur verfeinerten Analyse von pflanzenpathogenen Mikroorganismen und sind für eine genetische Differenzierung einzelner Mikroorganismen allgemein einsetzbar. Diese Gene erlauben – im speziellen Sonderfall des CD-Chromosoms – eine zusätzliche Einordnung der bereits in der Stammsammlung befindlichen *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Isolate. So geschehen beim Isolat 62060 (Abb. 2, Gelbahn-Nr. 11), das nun genauer auf seine Pathogenitätseigenschaften untersucht werden muss. Da dieses Isolat sich bereits seit 1970 in der JKI-Stammsammlung befindet, kann hier der Fall eines Verlustes des CD-Chromosoms im Laufe der Zeit eingetreten sein. Insgesamt sollen die beschriebenen Methoden zur Charakterisierung von Isolaten der JKI-Stammsammlung mit einfließen, um so zukünftig eine sicherere Zuordnung von Isolaten garantieren zu können.

Danksagung

Die Autoren danken der technischen Assistentin Frau Katrin BALKE vom Julius Kühn-Institut, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik in Braunschweig für die sorgfältige Durchführung der Versuche.

Literatur

- CORELL, J.C., C.J.R. KLITICH, J.F. LESLIE, 1987: Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology* **77**, 1640-1646.
- DAY, J.P., R.C. SHATTOCK, 1997: Aggressiveness and other factors relating to displacement of populations of *Phytophthora infestans* in England and Wales. *European J. Plant Path.* **103**, 379-391.
- DIMOND, A.E., 1970: Biophysics and biochemistry of the vascular wilt syndrome. *Annual Review Phytopathology* **8**, 301-322.
- GORDON, T.R., R.D. MARTYN, 1997: The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **35**, 111-128.
- MANDEEL, Q., Z.M. HASSAN, M.A. MELEIGI, R. BAKER, 1994: Penetration and colonization of cucumber roots by pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. *Phytopath. medit.* **33**, 137-145.
- NICHOLSON, P., D.R. SIMPSON, A.H. WILSON, E. CHANDLER, M. THOMSETT, 2004: Detection and differentiation of tricothecene and enniatin-producing *Fusarium* species on small-grain cereals. *European J. Plant Path.* **110**, 503-514.
- NIRENBERG, H., 1976: Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der Fusariensektion *Liseola*. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land- u. Forstw., Berlin-Dahlem H.* **169**, 1-117.

- RECORBET, G., C. STEINBERG, C. OLIVAIN, V. EDEL, S. TROUVELOT, E. DUMAS-GAUDOT, 2003: Wanted: pathogenesis-related marker molecules for *Fusarium oxysporum*. *New Phytol.* **159**, 73-92.
- REP, M., M. MELJER, P.M. HOUTERMAN, H.C. VAN DER DOES, B.J.C. CORNELISSEN, 2005: *Fusarium oxysporum* evades I-3-mediated resistance without altering the matching avirulence gene. *Mol Plant-Microbe Interact* **18**, 15-23.
- SOANES, D.M., T.A. RICHARDS, N.J. TALBOT, 2007: Insights from sequencing fungal and oomycete genomes: what can we learn about plant disease and the evolution of pathogenicity? *Plant Cell* **19**, 3318-3326.
- UTOMO, C., 2002: Studies on molecular diagnosis, identification and differentiation of *Ganoderma* the causal agent of basal stem root disease in oil palm. Dissertation, Universität Halle, 134 pp.
- VAN DER DOES, H.C., B. LIEVEN, L. CLAES, P.M. HOUTERMAN, B.J.C. CORNELISSEN, M. REP, 2008: The presence of a virulence locus discriminates *Fusarium oxysporum* isolates causing tomato wilt from other isolates. *Environm. Microbiology* **10**, 1475-1485.