



Universität Hamburg
DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Hamburg University of Applied Sciences



**Molekulargenetischer Nachweis des pathogenen Pilzes
Armillaria mellea in künstlich infizierter *Robinia
pseudoacacia***

Bachelorarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades

Bachelor of Science (B.Sc.)

an der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Fakultät Life Science

Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

Corinna Gebarowski

Hamburg, 17. Juli 2014

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Claus - Dieter Wacker

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences
Lohbrügger Kirchstraße 65
21033 Hamburg

Zweitgutachterin: Frau Prof. Dr. Elisabeth Magel

Universität Hamburg
Zentrum Holzwirtschaft
Leuschnerstraße 91d
21031 Hamburg

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum vom 25. März 2014 bis 17. Juli 2014 in der Abteilung Holzbiologie des Zentrums Holzwirtschaft der Universität Hamburg in den Räumlichkeiten des Thünen-Institutes.

An dieser Stelle möchte ich all Denjenigen meinen herzlichsten Dank aussprechen, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit zur Seite standen.

Frau Prof. Dr. Magel, für die Überlassung des interessanten Themas, die informativen Gespräche sowie für die Begutachtung und Bewertung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Wacker, für die freundliche Unterstützung und hilfreichen Anregungen, sowie für die Begutachtung und Bewertung meiner Arbeit.

Allen Mitarbeitern am Institut für Holzbiologie und ganz besonders Frau Ute Moreth für Ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft, Unterstützung und anregenden Gesprächen während des Entstehens der Arbeit.

Der Arbeitsgruppe, für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre – hier sind speziell Niko Wischnewski und Andreas Kampe zu erwähnen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich während des gesamten Studiums uneingeschränkt unterstützt hat und mir stets zur Seite stand.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	III
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
Zusammenfassung.....	X
1. Einleitung.....	1
1.1 <i>Robinia pseudoacacia</i> L.	1
1.2 <i>Armillaria mellea</i>	3
1.3 Aufbau und Funktion des Baumstammes	5
1.4 CODIT-Prinzip	7
1.5 Trockenstress und ihr Einfluss auf Bäume	9
1.6 ITS-Bereich.....	10
1.7 Ziel der Arbeit	11
2. Material und Methoden	12
2.1. Organismen	12
2.1.1 Pflanzenmaterial.....	12
2.1.2 Pilzmaterial.....	12
2.2 Geräte, Kits und Chemikalien	13
2.2.1 Geräte.....	13
2.2.2 Komponenten der verwendeten Kits	14
2.2.3 Sonstige Chemikalien	14
2.3 Methoden.....	15
2.3.1. Probenaufbereitung	15
2.3.2 DNA-Extraktion.....	18
2.3.3 Bestimmung der DNA-Konzentration.....	19
2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	20
2.3.5 Real-Time-PCR	22
2.3.6 Gelelektrophorese von DNA – Agarosegel	24
2.3.7 Aufreinigung der PCR Produkte.....	26
2.3.8 Sequenzierung.....	27
2.3.9 Entwicklung der Taxon-Primer	28
3. Ergebnisse und Diskussion	29

3.1	Kompartimentierung	29
3.2	Überprüfung der DNA-Extraktion mittels NanoDrop 2000	32
3.3	Erstellung der Taxon-Primer	34
3.3.1	Überprüfung der erstellten Taxon-Primer	38
3.4	Nachweis von <i>Armillaria mellea</i> in <i>Robinia pseudoacacia</i> Proben	42
3.4.1	Nachweis von <i>A. mellea</i> mit dem Taxon-Primer Amtaxfor 1/Amtaxrev a im Vorversuch	42
3.4.1.1	Überprüfung und Identifizierung des unbekanntes Pilzes mittels Sequenzierung.....	46
3.4.2	Festlegung eines weiteren Taxon-Primers für den Nachweis von <i>A. mellea</i> in <i>R. pseudoacacia</i> Proben im Hauptversuch	47
3.4.3	Nachweis von <i>A. mellea</i> in <i>R. pseudoacacia</i> Proben mit dem Taxon-Primer Amtaxfor b /Amtaxrev b im Hauptversuch	50
3.4.4	Bestätigung der Spezifität des Taxon-Primers Amtaxfor b/Amtaxrev b mittels Real-Time-PCR..	58
4.	Fazit	60
	Literaturverzeichnis	XI
	Quellenverzeichnis	XIV
	Erklärung	XV

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Robinia pseudoacacia</i> als ausgewachsener Baum in der Natur (Quelle: Online-Datenbank für Bäume und Sträucher, 2004).	1
Abbildung 2: Blüten- und Blätterstand des Laubbaumes <i>Robinia pseudoacacia</i> (Quelle: unserkraeutergarten.at).	1
Abbildung 3: <i>Armillaria mellea</i> mit Fruchtkörpern in freier Natur (Quelle: Mashroom Table, 2007). ...	4
Abbildung 4: <i>Armillaria mellea</i> kultiviert in einer Petrischale im Labor der Universität Hamburg. Besonders gut zu erkennen ist die markante Rhizomorphe.	4
Abbildung 5: Querschnitt durch einen Nadelholzstamm am Beispiel der Douglasie (<i>Pseudotsuga menziesii</i>). (Quelle: Biologie der Bäume von Matyssek et al., 2010).	6
Abbildung 6: Darstellung des CODIT-Modells. Kennzeichnung der drei strukturellen Wände die auf Fäule mit Abschottung in axialer, radialer und tangentialer Richtung reagieren. (Quelle: http://www.baumpfleger.at/image_2/codid_1.jpg).	7
Abbildung 7: ITS-Region (Internal Transcribed Spacer) der ribosomalen DNA mit den Bindungsorten der Primer ITS1.1 (forward), ITS3.1 (forward), ITS2.1 (reverse) und ITS4 (reverse) (Hanssen et al., 2011).	10
Abbildung 8: Grafische Darstellung des Querschnittes des Stammes der Robinie mit den jeweiligen Zonen Dü=Dübel, O=Callus, D=Decay-Zone, R=Reaction-Zone, S=Sound-Zone, Z=Scattered-Zone, ww=well watered, ws=water stressed.	16
Abbildung 9: Größenmarker der Agarose-Elektrophorese (Quelle: NIPPON Genetics).	25
Abbildung 10: Verfärbungsreaktion des künstlich infizierten Stammes der Robinie #10 ww Juli mit <i>Armillaria mellea</i> . In der Reaction-Zone werden Flavonoide eingelagert, die unter UV-Licht fluoreszieren.	29
Abbildung 11: Längsschnitt des künstlich infizierten Stammes der Robinie # 10 ww Juli. Deutliche Verfärbung der Reaktionszone auch ohne UV-Licht zu erkennen.	30
Abbildung 12: Darstellung der Absorption aufgetragen gegen die Wellenlänge in nm am Beispiel der Baumprobe #9 ws Juli. Die Kurven zeigen alle einen Absorptionspeak bei 260 nm.	33
Abbildung 13: Darstellung des ITS-Bereiches der Sequenzen von <i>Armillaria mellea</i> , verschiedener <i>Armillaria</i> -Arten und Basidiomyceten mittels Clustal X (1.81).	35
Abbildung 14: Darstellung der PCR-Produkte der Primerpaare auf einem 2,5%igen Gel. Als Template diente die <i>Armillaria mellea</i> Reinkultur. 1. Amtaxfor 1/Amtaxrev 1, 2. Amtaxfor 1/Amtaxrev a, 3. Amtaxfor 1/Amtaxrev b, 4. Amtaxfor a/Amtaxrev 1, 5. Amtaxfor a/Amtaxrev a, 6. Amtaxfor a/Amtaxrev b, 7. Amtaxfor b/Amtaxrev 1, 8. Amtaxfor b/Amtaxrev a, 9. Amtaxfor b/Amtaxrev b. Alle Primerpaare zeigen eine Amplifikation. Die Negativkontrollen zeigen keine Amplifikation auf. Zum Längenabgleich dient ein 100 bp Marker.	39
Abbildung 15: Ausschnitt aus dem Programm der Sequenzierung der Primer Amtaxfor 1/Amtaxrev a. Der Ausschnitt entspricht den Positionen 82 bis 415 im Alignment.	40
Abbildung 16: Ausschnitt aus dem Programm der Sequenzierung der Primer Amtaxfor b/Amtaxrev b. Der Ausschnitt entspricht den Positionen 83 bis 416 im Alignment.	40
Abbildung 17: Darstellung der PCR-Produkte der Robinenprobe #8 ws Juli mit Amtaxfor 1/Amtaxrev a. In = Inoculated, C = Control, R = Reaction-Zone; D = Decay-Zone, O = Callus, Dü = Dübel, S = Sound-Zone, +++ = <i>A. mellea</i> Reinkultur, --- = Negativkontrolle/Mastermixansatz. Alle getesteten Proben, bis auf die Positivkontrolle, zeigen keine Amplifikation. Zum Längenabgleich dient ein 100 bp Marker. .	42

Abbildung 18: Darstellung der PCR-Produkte der Robinie #8 ws Juli mit den Primer ITS1.1/ITS4. In = Inoculated, C = Control, R = Reaction zone; D = Decay zone, O = Callus, +++ = <i>A. mellea</i> Reinkultur, --- = Negativkontrolle/Mastermixansatz. Alle Proben konnten erfolgreich amplifiziert werden. Die Negativkontrollen zeigen keine Amplifikation. Zum Längenabgleich dient ein 100 bp Marker.	43
Abbildung 19: Darstellung der PCR-Produkte der Baumprobe #3 ws Feb. mit der Primer-Kombination Pilzfor 1/ITS4. In = Inoculated, C = Control, R = Reaction-Zone; D = Decay-Zone, O = Callus, Dü = Dübel, S = Sound-Zone, Z = Scattered-Zone, +++ = <i>A. mellea</i> Reinkultur, --- = Negativkontrolle/Mastermixansatz. Die Proben CS*, CO*, CZ, CZ* und InS* zeigen jeweils eine Bande in Höhe von 400 bp. Die Negativkontrollen zeigen keine Amplifikation. Zum Längenabgleich dient ein 100 bp Marker.	45
Abbildung 20: Abgleich der sequenzierten #3 ws Feb. Proben, mittels pilzspezifischer Primer Pilzfor 1/ITS4, mit der NCBI-Datenbank mittel BLAST. Identitätswert beträgt 99% bei einem query coverage von 97% für <i>Diaporthe phaseolorum</i>	46
Abbildung 21: Darstellung der PCR Produkte von <i>Armillaria mellea</i> Reinkultur, künstlich infizierter <i>R. pseudoacacia</i> und natürlich infizierter <i>R. pseudoacacia</i> aus dem Freiland mit den Primer-Kombinationen: Amtaxfor 1/Amtaxrev b, Amtaxfor b/Amtaxrev b, Amtaxfor 1/Amtaxrev 1 und Amtaxfor a/Amtaxrev 1. Mit allen Amtax-Primer lassen sich <i>A. mellea</i> Sequenzen amplifizieren, besonders gut mit Amtaxfor b/Amtaxrev b. Die Negativkontrollen zeigen keine Amplifikation. Zum Längenabgleich dient ein 100 bp Marker.	48
Abbildung 22: Darstellung der PCR-Produkte der Baumprobe #3 ws Feb. und #5 ww Feb. mit dem Primer Amtaxfor b/Amtaxrev b. In = Inoculated, C = Control, R = Reaction Zone; D = Decay Zone, Z=Scattered Zone, O = Callus, Dü = Dübel, S = Sound Zone. Proben der Robinie #3 ws Feb. zeigen Amplifikationen in den Zonen: CO, InS, InS*, InD, InR. Proben der Robinie #5 ww Feb. zeigen Amplifikationen in den Zonen CR und InO. Zum Längenabgleich dient ein 100 bp Marker.	51
Abbildung 23: Darstellung der PCR-Produkte der Baumprobe #8 ws Juli und #10 ww Juli mit dem Primer Amtaxfor b/Amtaxrev b. In = Inoculated, C = Control, R = Reaction-Zone; D = Decay-Zone, Z=Scattered-Zone, O = Callus, Dü = Dübel, S = Sound-Zone. Bis auf die Positivprobe, kam es zu keinen Amplifikationen. Zum Längenabgleich dient ein 100 bp Marker.	52
Abbildung 24: Grafische Darstellung des Querschnittes des Stammes der Robinie mit den jeweiligen Zonen Dü=Dübel, O=Callus, D=Decay-Zone, R=Reaktion-Zone, Z=Scattered-Zone, S=Sound-Zone, ww=well watered, ws=water stressed. Gelbe Markierungen zeigen die Zonen an, in denen <i>Armillaria mellea</i> DNA mit Hilfe der spezifisch entwickelten Taxon-Primer Amtaxfor b/Amtaxrev b amplifiziert werden konnte.	55
Abbildung 25: Dissoziationskurve der qPCR der Robinie #8 ws Feb. mit dem Primer Amtaxfor b/Amtaxrev b. Zu erkennen ist nur der Peak der Positivkontrolle bei der Schmelztemperatur von etwa 82,5°C und einer Fluoreszenz bei 3000.	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte und deren Hersteller, die während der Arbeit verwendet wurden	13
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Kits, ihrer Komponenten und Hersteller	14
Tabelle 3: sonstiger Chemikalien die während der Arbeit verwendet worden sind.....	14
Tabelle 4: Verwendetes Holzprobenmaterial und die dazugehörige Bezeichnung (ww = well watered, ws = water stressed) sowie der Inokulationszeitraum (Februar, Juli).....	15
Tabelle 5: Kennzeichnung der Zonen der verwendeten <i>Robinia pseudoacacia</i> Proben.....	15
Tabelle 6: PCR-Mastermix-Ansatz für eine Probe mit dem Taq Core Kit von Qiagen	21
Tabelle 7: PCR-Programm für die Primer ITS1.1/ITS4	21
Tabelle 8: Darstellung der Amplifikationsbereiche mit den zugehörigen Primer und Schmelztemperatur	22
Tabelle 9: Real-Time-PCR-Mastermix-Ansatz für eine Probe.....	23
Tabelle 10: Übersicht der Ergebnisse der Kompartimentierung der Robinienproben. Hier exemplarisch an den Proben #3 ws Feb., #8 ws Jul., #4 ww Feb., #10 ww Jul. zusammengefasst. ww=well watered, ws=water stressed	30
Tabelle 11: der spektralphotometrischen Analyse mittels NanoDrop 2000. Hier handelt es sich um <i>Robinia pseudoacacia</i> Baum #9 ws Juli. In = Inoculated, C = Control, R = Reaction Zone, D = Decay Zone, O = Callus, S = Sound Zone	32
Tabelle 12: Erstellte Taxon-Primer für <i>Armillaria mellea</i> unterteilt in Bereich, Name, Sequenz, Primer und Schmelztemperatur.....	37
Tabelle 13: Auflistung der Taxon-Primerpaare mit jeweiliger Länge [bp] und Durchschnittsschmelztemperatur	38
Tabelle 14: Verwendete Primerpaare mit entsprechender Elongationszeit für die PCR.....	38
Tabelle 15: Zusammenfassung der PCR-Ergebnisse der acht analysierten, künstlich infizierten Robinen unter dem Einsatz des Taxon-Primers Amtaxfor b/Amtaxrev b. Rot markierte Bereiche zeigen Proben an, die für eine Untersuchung nicht zur Verfügung standen. Grün markierte Bereichen zeigen Proben an, mit denen ein positiver Nachweis von <i>A. mellea</i> mit Amtaxfor b/Amtaxrev b möglich war	54
Tabelle 16: Übersicht der Zonen in denen <i>A. mellea</i> nachgewiesenen wurde. Dargestellt sind Proben des Februar Erntezeitraumes, eingeteilt nach dem Wasserversorgungszustandes ww (well watered) und ws (water stressed)	57

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. mellea</i>	<i>Armillaria mellea</i>
Bp	Basenpaare
C	Control
°C	Grad Celsius
CODIT	Compartmentalization of Damage in Trees
D	Decay-Zone
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
Dü	Dübel
For	Forward
In	Inoculated
ITS	Internal Transcribed Spacer
MEA	Malz-Extrakt-Agar
ml	Milliliter
O	Callus
PCR	Polymerasechainreactoin
qPCR	Real-Time-quantitative-PCR
R	Reaction-Zone
rDNA	Ribosomale
Rev	Reverse
rpm	rounds per minute
S	Sound-Zone
Sek	Sekunde
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus DNA Polymerase
µl	Mikroliter
ws	water stressed
ww	well watered
Z	Scattered-Zone

Zusammenfassung

Holzerstörende Pilze, wie *Armillaria mellea*, können im Stamm lebender Bäume Holzfäule verursachen und so die Überlebensfähigkeit des Baumes mindern, sowie die Holzqualität und die damit verbundene Verkehrssicherheit und wirtschaftlichen Erträge beeinträchtigen.

Gegen das Eindringen von Schadorganismen entwickelten sich im Laufe der Zeit viele Abwehrmethoden im Baum. So schottet die Robinie das Wachstum pathogener Pilze nicht nur durch Verthyllung ab, sondern auch durch die Synthese toxischer Inhaltsstoffe der Flavonide. Die Effizienz dieser Abwehrreaktion unterliegt jedoch unterschiedlichen Einflüssen. In dieser Arbeit werden Einflüsse wie klimatische Bedingungen und der Zeitpunkt einer Infektion untersucht.

Aus diesem Anlass soll nicht nur das Vorkommen des pathogenen Pilzes *Armillaria mellea* in Proben der zum Teil künstlich infizierten *Robinia pseudoacacia* ermittelt werden, sondern ferner Aufschluss über die Effizienz der Wundreaktion gewonnen werden.

Zu diesem Zweck wurden Robinien untersucht, die unterschiedlichen Infektionszeitpunkten und Wasserversorgungen ausgesetzt waren. Diese Robinien wurden zu unterschiedlichen Jahreszeiten künstlich mit dem pathogenen Pilz *Armillaria mellea* infiziert. Die Bäume wurden im Sommer Juli 2010 und im Winter Februar 2011 beimpft. Um die Auswirkung der Trockenheit auf die Abwehrreaktion der Bäume ermitteln zu können, wurden jeweils die Hälfte der Bäume unter gut bzw. schlecht bewässerten Umständen kultiviert.

Zur Durchführung wurden mit Hilfe von *A. mellea* Sequenzen, mehrere in der ITS-Region liegende forward-Primer und reverse-Primer erstellt, die in Kombination den gewünschten pathogenen Pilz amplifizieren. Die an bestimmte Voraussetzungen gebundene Primer-Entwicklung wurde optimiert und die Ergebnisse mittels PCR getestet, sodass am Ende die spezifischen Primer signifikant an *Armillaria mellea* binden.

Im Anschluss wurde aus den Holzproben, mit Hilfe eines Extraktionskits, DNA isoliert und einer DNA-Konzentrationsmessung unterzogen. Nach einer positiven Beurteilung der Ergebnisse kamen die entwickelten Primer-Kombinationen im Vervielfältigungsprozessschritt der PCR zum Einsatz.

Im letzten Arbeitsschritt ermöglichten die Gelelektrophorese und ihr Ergebnis eine anschauliche Darstellung der getesteten DNA in Form von Banden. Nach ihrer Auswertung war es möglich eine Bewertung bezüglich des Vorkommens des pathogenen Pilzes *Armillaria mellea* in der jeweils getesteten Holzprobe abzugeben und die Abschottungseffizienz des Baumes zu beurteilen.

Durch die in dieser Arbeit erstellten Taxon-Primer konnte der Pilz *A. mellea* amplifiziert bzw. nachgewiesen werden – wodurch der Einfluss der Stressfaktoren beurteilt werden konnte.

1. Einleitung

1.1 *Robinia pseudoacacia* L.

Echte Akazien sind aufgrund ihrer fehlenden Winterhärte in unseren Breiten nicht überlebensfähig. Daher werden alle bei uns vorkommenden Akaziemarten Robinien oder auch Scheinakazien genannt. Abbildung 1 zeigt eine etwa zehn bis zwölf Meter große, freistehende Robinie mit ihrer rundlichen, schirmartigen Krone und dem recht kurzen Stamm. Der lateinische Name der *Robinia pseudoacacia* ist leicht irreführend, da der Baum nur äußerlich, im Bereich der Dornen und dem Blattstand, Ähnlichkeiten mit ihrem Namensvetter, der Akazie, aufweist. In Abbildung 2 sind die unpaarig gefiederten Laubblätter und die weißen, zwittrigen Blüten die in hängenden Trauben als Blütestände zusammengefasst sind, gut zu erkennen. Artverwandt ist die Gewöhnliche Robinie mit den Schmetterlingsblütlern (Leguminosae oder Faboideae) und gehört zur Familie der Hülsenfrüchtler (Fabaceae).

Ursprünglich stammt der immergrüne Laubbaum aus dem östlichen und mittleren Nordamerika und ist erst seit dem 17. Jahrhundert in Europa angebaut, erstmals 1638 in Paris. In Deutschland wurden die ersten Falschen Akazien in der zweiten Hälfte des 18. Jahrhunderts angepflanzt. Mittlerweile ist *Robinia pseudoacacia* überall in Mittel- und Südeuropa verbreitet und kommt ebenfalls verwildert vor (Krausch, 2001).



Abbildung 1: *Robinia pseudoacacia* als ausgewachsener Baum in der Natur (Quelle: Online-Datenbank für Bäume und Sträucher, 2004).



Abbildung 2: Blüten- und Blätterstand des Laubbaumes *Robinia pseudoacacia* (Quelle: unser-kraeutergarten.at).

Besonders beliebt ist ihr Einsatz bei der Aufforstung von Flugsand- und Steppenböden, Schutthalden und Böschungen. Heute ist die Robinie nach Eukalyptus- und Pappelarten der weltweit am häufigsten kultivierte Laubbaum. Das überwiegende Ziel dieser Kultivierung ist die Bodenverbesserung (Stickstoffeintrag) und die Haldenbefestigung. Aufforstungen zum Zweck der Holzproduktion bestehen vornehmlich in Südosteuropa mit den größten Flächen in Ungarn und Rumänien (Molnar, 1989; Göhre, 1952). In Ungarn nimmt sie etwa 22,6 % der gesamten Waldfläche ein (Führer, 2005).

Das Holz der Robinie ist schwer und hart. Es zählt zu ihren Eigenschaften schwer spaltbar, zäh und elastisch, sowie gut biegsam zu sein. Weiter zeichnet sich die Robinie durch eine überdurchschnittliche Belastbarkeit bei dynamischer Beanspruchung aus. Durch die hohe Kantenfestigkeit die das Holz besitzt, bleiben gehobelte Flächen dicht und glatt und lassen sich somit problemlos weiterbehandeln. Das Kernholz selbst besitzt eine natürliche hohe Resistenz gegenüber holzerstörenden Pilzen und Insekten. Grund dafür sind im Kernholz enthaltene Inhaltsstoffe, die toxisch auf diese wirken. Die Robinie zählt zu den ganz wenigen wachsenden Holzarten der Resistenzklasse 1 nach DIN 68364 in Europa (Noack und Schwab, 1988).

Die im Baum mengenmäßig am meisten vorhandenen spezifischen Flavonoide, Robinetin und Dihydrobinetin, bewirken nicht nur die natürliche Dauerhaftigkeit, sondern können unter Umständen bei empfindlichen Personen allergische Reaktionen der Haut, wie Dermatitis und Ekzeme, hervorrufen (Lange und Schwager, 1997).

Aufgrund der guten Eigenschaften wie Festigkeit, Verarbeitbarkeit, Stehvermögen und natürliche Dauerhaftigkeit ist das Holz vielseitig einsetzbar. So eignet es sich im Außenbereich allgemein als Konstruktionsholz. Seine Verwendung kommt im Garten- und Landschaftsbau sowie für Fahrzeugaufbauten, Türen und Fenster, Tore, Zäune und vieles mehr zum Einsatz. Im Innenbereich kann es für Treppen, Parkett sowie Klein- und Sitzmöbel angewendet werden.

Dank seiner hohen dynamischen Beanspruchbarkeit eignet sich Robinie besonders für hochwertige Werkzeugstiele sowie für Turn- und Sportgeräte. Weiter wird das Holz in der Landwirtschaft und im Obstbau als Zaun- bzw. Stützpfähle verarbeitet (Göhre, 1952).

1.2 *Armillaria mellea*

Der Hallimasch (*Armillaria mellea*) wird umgangssprachlich als Honigpilz bezeichnet (Abbildung 3). Er gehört zur Klasse der Ständerpilze (*Basidiomyceten*) und gehört der Familie *Armillariaceae* (Hallimaschartige) an (Nierhaus-Wunderwald, 1994).

A. mellea ist weltweit verbreitet und wird heute in sieben Arten eingeteilt. Die Arten zeigen Unterschiede in der geographischen Verbreitung, ökologischen Stellung, ihrer Wirtsspezifität, in mikroskopischen- und makroskopischen Merkmalen, sowie in ihrer Aggressivität, mit der sie Wirte befallen.

Der Honiggelbe Hallimasch gehört zu den fünf wichtigsten Arten der Gattung Hallimasch in Europa. Zu nennen sind:

- *Armillaria mellea*
- *Armillaria ostoyae*
- *Armillaria gallica*
- *Armillaria cepistipe*
- *Armillaria borealis*

A. mellea besitzt ein breites Wirtsspektrum und befällt bevorzugt Laubbäume (Roll-Hansen, 1985). Hier tritt der Pilz gelegentlich als sehr aggressiver Primärparasit auf. Häufiger besiedelt er allerdings geschwächte Bäume. Aus diesem Grund zählt der Honiggelbe Hallimasch, sowie die Mehrzahl der Arten, zu den Saprobionten. Die sogenannten Saprophyten gelten als Organismen, die ihre benötigten Nährstoffe aus totem Material gewinnen. Ihre Nährstoffe beziehen sie daher aus verwestem Tier- oder Pflanzenmaterial bzw. ernähren sich überwiegend vom toten Holz.

Einzelne Arten, darunter auch *Armillaria mellea*, sind jedoch gefürchtete Parasiten, da sie in lebenden Bäumen jeden Alters eine Wurzel- und Stockfäule verursachen können. Sie sind pathogen. Seit Harting (1873) zählt man heute über 600 Gehölzarten zum Wirtskreis der Pilzgattung (Schwarze et al., 1999).

Die Besiedlung eines Baumes erfolgt in der Natur bei den Hallimascharten durch Rhizomorphe an Baumstümpfen, durch Sporenbildung oder durch Wurzelkontakte zwischen benachbarten Bäumen (Nierhaus-Wunderwald, 1994).

Rhizomorphe sind wurzelähnliche Stränge aus Pilzhyphen, die in unterschiedlichster Form auftreten können. So findet man sie z.B. häufig im Boden um infizierte oder abgestorbene Bäume. Die „*Rhizomorpha subterranea*“ ist schnurrartig und durchwächst den Boden und das Holz, welches von anderen Pilzen zersetzt ist. Die sehr dünne „*Rhizomorpha fragilis*“ hingegen durchdringt als Infektionsrhizomorphe die Wurzeln des betroffenen Baumes. Sobald diese das Kambium erreicht haben, bildet sich die „*Rhizomorpha subcorticalis*“ zwischen Rinde und Holz im Kambium.

Ist ein Fächermyzel dieser Art vorhanden, deutet es darauf hin dass der Hallimasch den Baum als Parasit abtötet und nicht saprophytisch besiedelt. In Abbildung 4 ist eine Reinkultur des Pilzes *A. mellea* in einer Petrischale aus dem Labor der Universität Hamburg zu sehen. Es zeigt vor allem die markante schwarzbraune, milimeterdicke Rhizomorphe.

Gelingt es dem Hallimasch das Kambium an der Stammbasis auf dem ganzen Umfang zu zerstören, stirbt der Baum oft sehr schnell innerhalb weniger Wochen, ab. Trotz solch eines Krankheitsverlaufes muss die Standsicherheit des Baumes nicht beeinträchtigt sein. Daher kommt es oft vor, dass Bäume, die vom Hallimasch befallen sind, stehend sterben.

Die Pilzgattung kann Stock- und Wurzelfäule im Wirten verursachen. Wenn der Befall auf einzelnen Wurzeln oder Teile des Wurzelstockes beschränkt ist, entwickelt sich häufig eine Kernfäule. Über das Kernholz der stärkeren Wurzeln kann sich der Pilz in Richtung Stamm ausbreiten.

In verschiedenen Studien hat man nachgewiesen, dass ein Pilzindividuum Gebiete mit einer Gesamtfläche von neun Hektar durchwachsen kann (Shaw und Kile, 1991). Einige Berechnungen über die Gesamtmasse der Rhizomorphen auf besagter Fläche haben ergeben, dass sie höher ist, als das Gewicht eines Blauwals. Damit ist der Hallimasch ohne Zweifel eines der größten Lebewesen der Erde (Schwarze et al., 1999). Abbildung 3 zeigt die buschelartige Art des Wachstums von *A. mellea*, welches auch das Hauptunterscheidungsmerkmal zu anderen Hallimasch-Arten ist. Mit dieser Methode wächst der Pilz massenhaft ab Ende September und im Oktober an zumeist absterbenden Bäumen, Wurzeln und Strünken (Nierhaus-Wunderwald et al., 2012).



Abbildung 3: *Armillaria mellea* mit Fruchtkörpern in freier Natur (Quelle: Mushroom Table, 2007).

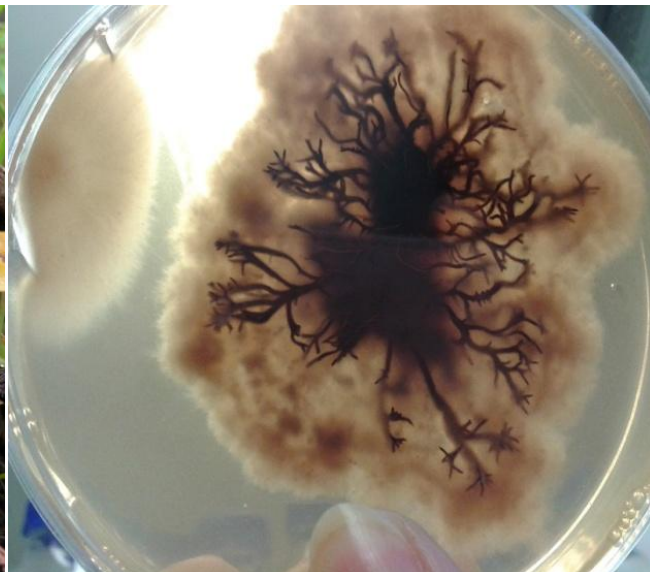


Abbildung 4: *Armillaria mellea* kultiviert in einer Petrischale im Labor der Universität Hamburg. Besonders gut zu erkennen ist die markante Rhizomorphen.

1.3 Aufbau und Funktion des Baumstammes

Für ein besseres Verständnis zur Schadensabwehr von Bäumen wird im Folgenden ein kurzer Überblick über den Aufbau und Funktion von Rinde, Kambium und Holz gegeben.

Die Robinie gehört zu den Höheren Pflanzen und wird als Kormophyt bezeichnet, womit Sprosspflanzen gemeint sind. Erkennbar ist dies durch die Grundeinteilung in Sprossachse, Blatt und Wurzel. Die Sprosspflanzen beinhalten sogenannte Meristeme, welches ein Bildungsgewebe ist, mit denen die Sprosspflanze wächst.

Hierbei unterscheidet man zwischen Apicalmeristeme und Lateralmeristeme. Ersteres ist hauptsächlich für das Längenwachstum der Pflanze verantwortlich. Das Lateralmeristem, welches sich vom lateinischen Begriff „lateralis“ ableitet und so viel wie „seitlich“ bedeutet, sorgt für das Dickenwachstum. Es umschließt die Organachse zylinderförmig und bildet stark verholzte Organe. Das laterale Meristem, auch Kambium genannt, sorgt somit für die Erweiterung des Umfangs der Sprossachse von Bäumen und Sträuchern.

Lokalisiert ist das Kambium zwischen Rinde und Holz und produziert nach außen sekundäres Phloem (Bast) und nach innen sekundäres Xylem (Holz). Das Kambium wird auch als sekundäres Meristem bezeichnet und ist eine dünne Zellschicht, die den wachsenden Teil des Baumes darstellt.

Der Bast ist der innere und damit jüngere Teil der Rinde. Dieser dient dem Assimilattransport und versorgt den Baum mit Nährstoffen. In Laubbäumen sorgen Siebröhren für den hauptsächlichlichen Transport von Kohlenhydraten. Diese Art von Reservestoffen werden in sogenannten Parenchymzellen eingelagert. Diese können auf Verletzungen reagieren, indem sie Schutzstoffe produzieren oder Wundperiderme bilden, womit sie den Schaden abschotten. Der Bast stirbt relativ schnell ab und bildet sich zu Kork und schließlich zur Borke.

Die äußerste Schicht des Baumes ist die Borke. Sie bezeichnet alle außerhalb des innersten Korkkambiums gelegten Gewebeschichten aus Resten der primären Rinde, älteren Phloem und älteren Periderm. Dieser ältere Teil der Rinde ist abgestorbenes Gewebe und schützt insbesondere vor Verdunstung, Hitze in Form von beispielweise Sonneneinstrahlung und Feuer. Durch die eingelagerten Schutzstoffe, wie Wachse und Suberin, schützt es auch vor Befall durch Pilze, Insekten und mechanischen Schäden. Die Borke wird ständig an der Oberfläche durch Verwitterung abgelöst und gleichzeitig durch die neuen, tiefer in der Rinde liegenden Periderme, ersetzt.

Das Holz macht volumenmäßig den größten Anteil des Baumes aus. Er hat drei Funktionen: Transport von Wasser und Nährsalzen, Speicherung von Reservestoffen und Festigkeit. Unterteilen lässt sich das Holz grob in das Splintholz (sekundäres Xylem) und dem Mittelpunkt des Baumstammes, dem Kernholz, der das Mark umschließt. Das Splintholz versorgt den Kronenraum mit Wasser und Nährsalzen. Mit der Bildung neuer Splintholzringe

verlieren die inneren Ringe ihre Funktion und werden zu Kernholz. Das Kernholz ist totes Gewebe, welches phenolische Komponenten eingelagert hat und so die natürliche Dauerhaftigkeit erhöht (Matyssek et al., 2010). In Abbildung 5 ist eine grafische Veranschaulichung des Querschnittes eines Nadelholzstammes aufgeführt.

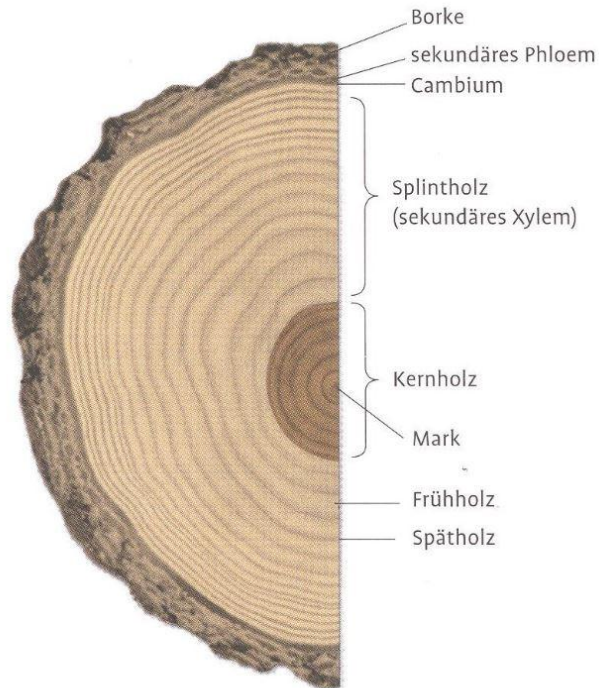


Abbildung 5: Querschnitt durch einen Nadelholzstamm am Beispiel der Douglasie (*Pseudotsuga menziesii*). (Quelle: Biologie der Bäume von Matyssek et al., 2010).

1.4 CODIT-Prinzip

Bereits im vorletzten Jahrhundert wurden Wundreaktionen von Bäumen beobachtet. Dabei wurden Abschottungen des funktionsfähigen Holzes gegenüber dem abgestorbenen bzw. infizierten Gewebe beschrieben (Shigo und Marx, 1977). Die Beobachtungen dienten dem grundlegenden Verständnis über den Aufbau von Bäumen und deren Abwehrreaktionen gegenüber Krankheiten.

Mit wachsendem Umweltbewusstsein stieg in den 1970er und 1980er Jahren der Bedarf an pflegenden und erhaltenden Maßnahmen für Bäume. Das Arbeitsgebiet des amerikanischen Forstbiologen Alex Shigo war zu dieser Zeit die Beschäftigung mit komplexen Reaktionen von Bäumen nach Verletzungen. Er erstellte hierzu eine modellhafte Darstellung auf und benannte es CODIT.

Das CODIT-Modell beschreibt vereinfacht den Aufbau von Bäumen und deren Reaktion auf Fäule. CODIT steht für Compartmentalization of Decay in Trees (Abschottung von Fäule in Bäumen). Dieses Modell über die Wundreaktionen von Bäumen entwickelten erstmals Shigo und Marx (1977). Das Modell befasst sich mit der räumlichen Ausdehnung eines Pilzbefalls im Baum nach einer Verletzung und der damit einhergehenden Abschottung. Im CODIT-Modell wird der Baum als ein gekammerter Organismus dargestellt, der strukturelle Wände enthält (Abbildung 6). Diese reagieren auf Fäule mit Abschottung. In axialer Richtung liegt Wand 1, Wand 2 begrenzt in radialer Richtung zur Stammmitte und Wand 3 in tangentialer Richtung. In diesem Modell steht Wand 1 für die schwächste Abschottung und Wand 3 für die stärkste.

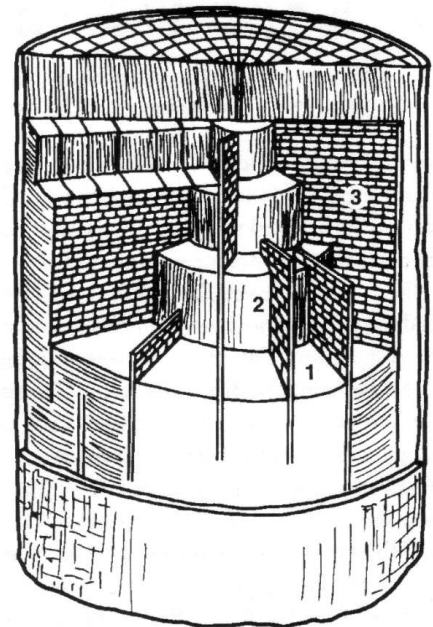


Abbildung 6: Darstellung des CODIT-Modells. Kennzeichnung der drei strukturellen Wände die auf Fäule mit Abschottung in axialer, radialer und tangentialer Richtung reagieren. (Quelle: http://www.baumpfleger.at/image_2/codid_1.jpg).

Durch die wesentliche Erkenntnis, dass Bäume nach einer Verletzung nicht auf Fäulnis sondern auf die eindringende Luft reagierten, entwickelte sich das CODIT-Modell weiter zum CODIT-Prinzip (Dujesiefken und Lisie, 2008). Direkt nach einer Verletzung sorgt die Luftembolie im wasserleitenden Gewebe für eine Funktionsstörung. Erst im Nachhinein schottet der Baum sich gegen die Fäule ab. Aus diesem Grund wird CODIT heute als Compartmentalization of Damage in Trees (Abschottung von Schäden in Bäumen) erfasst. Der Begriff „Damage“ ist umfassender und schließt alle Veränderungen nach allen Verletzungsarten mit ein.

Das CODIT-Prinzip beschreibt die Abschottung von Schäden in Bäumen sowie die Überwallung bzw. Einkapselung in zeitlicher Abfolge. Die Wundreaktionen können im

Einzelfall sehr unterschiedlich ausfallen, dem ungeachtet ist folgendes Prinzip erkennbar: Die Abschottung und Überwallung von Schäden erfolgen in aufeinander folgenden Phasen.

Die Wundreaktion von Bäumen geschieht geradewegs nach einer Verletzung. Laut CODIT-Prinzip lassen sich folgende Reaktionen einteilen:

1. Phase: Eindringende Luft

Durch das Eindringen der Luft stirbt das Gewebe in Wundnähe ab. Es folgt die Bildung eines Kallus am Wundrand. Das Kallusgewebe entsteht durch verstärkte Zellteilung aus anfangs undifferenzierten Zellen. Seine Bildung wird durch die Aufhebung des „Rindendrucks“ ausgelöst. Durch diese Funktion wird der Wundverschluss eingeleitet. Weiter bildet sich eine Grenzschicht durch das Kambium in Wundnähe. Diese, auch Reaktionszone genannt, ist als Verfärbung sichtbar.

2. Phase: Eindringen von Schaderregern z.B. holzerstörende Pilze

Auf Grund der Wunde können Pathogene im Holz bis zur Grenzschicht eindringen. Zur Überwallung der Wunde bildet sich aus dem Kallus ein Überwallungswulst.

3. Phase: Ausbreitung der Schaderreger

Die in Phase 1 vom Kambium gebildete Grenzschicht kann unter Umständen von Pilzen überwunden werden. Daher erfolgen die Ausbildung einer neuen Grenzschicht und die intensiviertere Bildung von Inhaltsstoffen in der Reaktionszone. Dies mindert eine zunehmende Ausbreitung des Fremdmaterials. Ferner wächst die Überwallungswulst weiter über die Wunde.

4. Phase: Einkapselung der Schaderreger

Die Überwallwulst schließt den Schaderreger im Baum luftdicht ein. Diese letzte Phase der Einkapselung ist die Überlebensstrategie von Bäumen nach Verletzungen (Dujesiefken und Liese, 2008). Falls die Wunde nicht eingekapselt werden kann, bleiben die Schaderreger aktiv und bedeuten eine zumindest nicht sichtbare Gefahr für den Baum.

Kann Phase 4 nicht erreicht werden, z.B. auf Grund einer zu großen Wunde, verbleibt die Wunde in Phase 3 und die holzerstörenden Pilze können sich weiter ausbreiten.

1.5 Trockenstress und ihr Einfluss auf Bäume

Holzschäden entstehen meist durch den gemeinsamen Einfluss von biotischen und abiotischen Faktoren. Folglich ist es nicht ein einzelner Faktor der die Schäden am Holz verursacht, sondern das Zusammenwirken verschiedener Faktoren (Dujesiefken, 1995).

Ein nennenswerter externer Faktor, der einen Einfluss auf den endogenen Verlauf eines Baumstammes ausübt, ist der klimatisch bedingte Trockenstress. Hohe Temperaturen führen zu Beginn der Vegetationsperiode zur Bildung einer weiteren Kambiumzone und großer Zellproduktion über den ganzen Sommer. Im Herbst dagegen wird die kambiale Aktivität verlangsamt und im Winter komplett eingestellt. Kurze Tage und niedrige Nachttemperaturen leiten einen starken Rückgang der Auxinproduktion und einen Anstieg des Hemmstoffgehaltes (Abscisinsäure und Ethylen) ein. Dabei regen Auxine das Kambium zur Zellteilung an. Die Folge bei Laubbäumen ist eine rasche Alterung der Blätter und der daran anschließende Laubfall (Bavendamm, 1974).

Abgesehen von der Temperatur ist akuter Wassermangel von Bedeutung. Dieser tritt in Mitteleuropa regelmäßig im Frühjahr auf. Der Wassermangel gefährdet vor allem die Verjüngung und gilt sogar als Auslöser für komplexe Waldkrankheiten, wie das Tannen- und Eichensterben.

Als Folge des Wassermangels und der damit verbundenen Schwächung der Bäume, treten oft Insektenkalamitäten auf. Der Trockenstress wird durch überwiegend zwei Prozesse verstärkt. Zum einen verliert der ausgetrocknete Boden seine Benetzbarkeit in Bezug auf Flüssigkeiten, sodass auftretender Starkregen zu hohen Anteilen nicht aufgenommen wird sondern oberflächlich abfließen. Und zum anderen müssen die Pflanzen bei Trockenheit Wasser zur Kühlung der Blätter abgeben.

Bei Trockenheit wird die Stoffumwandlung körperfremder in körpereigene Stoffe eingeschränkt. Bleibt dieser Zustand zu lange erhalten, können unterschiedliche Stressreaktionen auftreten. Einerseits können Blätter und ganze Zweige grün abgeworfen werden, andererseits kann die zu früh einsetzende herbstliche Laubfärbung und Laubfall die Folge sein. Dieses Verhalten sind Anpassungsreaktionen, um den Wasserverlust zu begrenzen.

Nimmt die Vitalität eines Baumes ab, so vermindern sich ebenfalls seine Abwehrreaktionen und das Risiko eines Insektenbefalls und von Frostschäden ist erhöht. Dabei kann Trockenheit unter Umständen die Vermehrung und Aggressivität von Schadinsekten in den geschwächten Bäumen fördern. Wichtig ist, dass Bäume die sich erst am Standort etablieren müssen (Verjüngungen), stärker und früher von Welkeerscheinungen betroffen sind, als ältere Bäume mit tiefgreifendem Wurzelwerk (Collin, 2014).

1.6 ITS-Bereich

Eine molekulargenetische Methode zur Bestimmung der Identität eines Organismus basiert auf dessen "genetischen Fingerabdruck". Bei Zellen von Eukaryoten befindet sich der größte Anteil der DNA im Zellkern, angeordnet als Chromosom. In der Pflanzensystematik hingegen werden am häufigsten Plastiden-Gene bzw. bestimmte Genabschnitte und die ribosomalen DNA des Zellkerns eingesetzt.

Die ITS-Region (Internal Transcribed Spacer; (Gardes und Bruns, 1993)) ist ein relativ kurzer Abschnitt der DNA-Sequenz der Ribosomen. Phylogenetische Untersuchungen auf molekularer Ebene haben gezeigt, dass sich die schnell evolvierende ITS-Region der ribosomalen DNA überaus gut für Identifizierung von Organismen und somit auch von Holz- bzw. Pilzarten eignet. Da diese Sequenzen bei höheren Pflanzen einer schnellen evolutionären Entwicklung unterliegen, führt zwischen den Arten, in Sequenz und Länge, zu Unterschieden (Feliner und Roselló, 2007).

Die ITS-Region ist zwischen den konservierten Regionen 18S und 26S rDNA lokalisiert und besteht aus der ITS1 und der ITS2 Unterregion, zwischen denen sich die konservierte 5.8S rDNA befindet (Baldwin et al., 1995). Abbildung 7 gibt den schematischen Aufbau der ITS-Region wieder. Die Sequenzen dieser ITS-Region sind sich bei Gattungen Höherer Pflanzen sehr ähnlich und auf diese Weise leicht zu vergleichen. Dennoch sind sie variabel genug, um Unterschiede zwischen den Arten zu zeigen, da sich die nicht kodierenden Regionen viel schneller verändern als nicht kodierende Regionen.

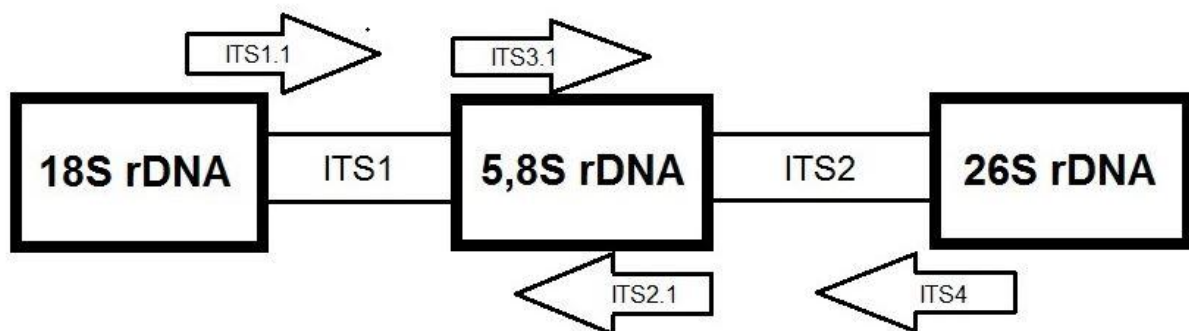


Abbildung 7: ITS-Region (Internal Transcribed Spacer) der ribosomalen DNA mit den Bindungsorten der Primer ITS1.1 (forward), ITS3.1 (forward), ITS2.1 (reverse) und ITS4 (reverse) (Hanssen et al., 2011).

Mit Hilfe von universellen ITS Primer (ITS1 und ITS4) ist es möglich, die gesamte ITS-Region zu identifizieren und zu amplifizieren (White et al., 1990). Dabei ist zu beachten ist, dass die Amplifikation mit den universellen Primern ITS1 und ITS4 neben den pflanzlichen Sequenzen auch die von Pilzen erfasst (Zhang et al., 1997).

Durch die relativ geringe Größe der ITS-Region, die ca. 600 bis 800 Basenpaare (bp) umfasst, lässt sie sich leicht amplifizieren (Gardes und Bruns, 1993). Ist z.B. die Sequenz einer ITS-Region einer bestimmten Holz- bzw. Pilzart bekannt, können spezifische Taxon-Primer erstellt werden, welche nur dann ein Produkt in der PCR ergeben, wenn DNA aus dieser Holz- bzw. Pilzart als Template vorliegt. So erfassen z.B. die Primer ITS3.1 und ITS2.1 nur pflanzliches Material, wodurch die Teilbereiche ITS1 und ITS2 amplifiziert werden (Hanssen et al., 2011).

1.7 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den pathogenen Pilz *Armillaria mellea* in den künstlich infizierten Holzproben der *Robinia pseudoacacia* nachzuweisen und somit eine Beurteilung über die Effizienz der Abschottung gegenüber einer Pilz-Ausbreitung im Baum abgeben zu können.

Der quantitative Aspekt spielt hierbei eine wesentlich entscheidendere Rolle als der qualitative Aspekt.

Mit Hilfe der in der ITS-Region liegenden Taxonprimer soll untersucht werden, ob und wie weit der pathogene Pilz, trotz Abschottungsmechanismus des Baumes, eindringen kann. Mittels der spezifisch entwickelten Primer und der zum Einsatz kommenden Polymerase-Kettenreaktionen, kann die DNA jeder getesteten Zone auf das Vorkommen des inokulierten Pilzes untersucht werden.

Da die getesteten Robinien zu verschiedenen Jahreszeiten und unter unterschiedlichen Bedingungen infiziert wurden, sollen die Resultate ebenfalls Aufschluss darüber geben, ob sich stark beanspruchte Bäume anders in ihrer Abwehrreaktion gegenüber Pilzschäden verhalten als gut bewässerte – in Abhängigkeit der Jahreszeit.

Das System sollte ebenso frei von Kontaminationen und unspezifischen Bindungen sein, sodass eine eindeutige Zuordnung möglich ist.

2. Material und Methoden

2.1. Organismen

2.1.1 Pflanzenmaterial

Die verwendeten Bäume wurden in Töpfen im Arboretum des Thünen Institutes kultiviert. Für den Versuch wurden zwölf, sieben Jahre alte, Robinien (*Robinia pseudoacacia*) herangezogen, wovon eine Hälfte unter gut bewässerten Umständen kultiviert und die andere Hälfte von Trockenheit beeinflusst wurde. Um den Einfluss von Regen zu minimieren, wurden die trockengestressten Pflanzen mit Plastikfolien im Zeitraum von Juni bis Oktober abgeschirmt.

In die Baumstämme wurden in Höhe von 30 und 60 cm über dem Boden Löcher mit einem Durchmesser von 8 mm und 15 mm Länge gebohrt. Der infizierte Holzdübel wurde in das tiefere Loch gesteckt.

Weiter wurden die Bäume zu unterschiedlichen Jahreszeiten infiziert – im Juli 2010 und im Februar 2011 (Aslam Jabeen, unveröffentlicht).

Auf Grund des engen zeitlichen Rahmens, der für die Bachelorarbeit vorgesehen war, wurden von den zwölf genannten Robinien, acht Stämme genauer untersucht.

2.1.2 Pilzmaterial

Für die künstliche Inokulation wurde der Honigpilz *Armillaria mellea* (120.59), ein holzersetzender Basidiomycete vom Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) in Baarn, Niederlande, herangezogen.

Der Pilz wurden auf einem 2%-igen Malzextrakt-Agar (MEA) kultiviert. Nach drei Wochen wurden autoklavierte Buche-Holzdübel auf das Myzel bzw. auf den sterilen Agar (Verwendungskontrolle) gelegt. Nach weiteren sechs Wochen Kultivierung hatte das Myzel, mit Ausnahme des sterilen Ansatzes, den Holzdübel überwachsen und konnte als Inokulum verwendet werden.

Der Inokulationszeitraum der im Sommer infizierten Robinien began vom 14. Juli .2010 bis zum 06. Juli 2012 und der Zeitraum der im Winter infizierten Bäume begann vom 02. Februar 2011 bis zum 06. Juli 2012.

2.2 Geräte, Kits und Chemikalien

In den folgenden Tabellen 1, 2 und 3 sind die Geräte, Kits und Chemikalien aufgelistet, die während der Arbeit verwendet worden sind.

2.2.1 Geräte

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte und deren Hersteller, die während der Arbeit verwendet wurden

Gerät: Name	Hersteller
Analysewaage: Explorer	OHAUS®
Elektrophoresekammer, Gelschlitten, Gelkamm	i-Mupid
Gel Dokumentation System: Gel Doc	Bio-Rad Laboratories
Mikrowellengerät	Panasonic
Pipetten: 0,1-1000 µl	Eppendorf
Reinstwasseranlage: Nano Pure	Barnstead, Thermo Scientific
Spektralphotometer: NanoDrop 2000	Thermo Scientific
Schweißgerät	Lava
Thermoblock: HLC	DITABIS
Thermozykler: Tpersonal und Tgradient	Biometra®
Vortexer: MS2 Minishaker	IKA®
Zentrifuge: Heraeus Pico 17 Centrifuge	Thermo Scientific

2.2.2 Komponenten der verwendeten Kits

Tabelle 2 führt die verwendeten Kits mit ihren jeweils enthaltenen Komponenten, sowie den Hersteller auf.

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Kits, ihrer Komponenten und Hersteller

Kit	Komponenten	Hersteller
DNeasy [®] Plant Mini Kit	QIAshredder Säule	Qiagen
	DNeasy MiniSpin Säule	
	Puffer AP1	
	Puffer AP2	
	Puffer AP3	
	Puffer AW1 (+Ethanol)	
	Puffer AE	
PCR Core Kit	5x Q Solution	Qiagen
	10x PCR Buffer	
	dNTP Mix	
	Taq-Polymerase	
QIAquick [®] PCR Purification Kit	QIAquick Spin Columns	Qiagen
	Puffer PB	
	Puffer PE (+Ethanol)	
	Puffer EB	
Brilliant II SYBR [®] Green QPCR Master Mix Kit	Stratagene Mix	Stratagene
	ROX	

2.2.3 Sonstige Chemikalien

In Tabelle 3 sind alle weiteren Chemikalien gelistet, die während der Arbeit verwendet wurden – sowie die Hersteller.

Tabelle 3: sonstiger Chemikalien die während der Arbeit verwendet worden sind

Chemikalien	Hersteller
Agarose	SERVA
DNA AWAY™	Carl Roth
Ethanol (≥ 99,8 % p.a.)	Carl Roth
Ethidiumbromid (1 % Lösung)	Carl Roth
GelPilot 100 bp Plus Ladder (Größenmarker)	Qiagen
Ladepuffer (0,25 % Bromphenolblau, 30 % Glycerin)	Laborbestand
TAE-Puffer (50x Stock-Lösung: 2 M TRIS, 1 M Acetat, 50 mM EDTA)	Laborbestand

2.3 Methoden

2.3.1. Probenaufbereitung

Die acht zu untersuchenden, künstlich infizierten Robinen, lagen gefriergetrocknet zur Verfügung. Es galt die DNA, die in Form der Baumstämme vorlag, so zu verarbeiten, dass sie für Laborversuche in Menge und Beschaffenheit geeignet waren. Die gewonnenen DNA-Proben wurden anschließend auf *A. mellea* Befall untersucht.

Die Einteilung der Proben erfolgte nach dem Stressfaktor der Bewässerung in „well watered“ (gut bewässert) und „water stressed“ (trockengestresst). Von den acht getesteten Bäumen wurden vier im Sommer (Juli) und vier im Winter (Februar) inokuliert. Jeder Robinie inkludierte eine Inokulierte- und Kontrollprobe. Das verwendete Probenmaterial und dessen Bezeichnung sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Verwendetes Holzprobenmaterial und die dazugehörige Bezeichnung (ww = well watered, ws = water stressed) sowie der Inokulationszeitraum (Februar, Juli)

Baumproben							
ww				ws			
Kontrolle		Inokuliert		Kontrolle		Inokuliert	
Feb.	Jul.	Feb.	Jul.	Feb.	Jul.	Feb.	Jul.
#4	#10	#4	#10	#3	#8	#3	#8
#5	#11	#5	#11	#4	#9	#4	#9

Jeder Baum, einschließlich der Inokulierten und Kontrollproben, umfasst bis zu 12 Zonen, die untersucht werden müssen. Aufgrund des ersten und zweiten Eluates nach der Extraktion (Kapitel 2.3.2), ergaben sich demzufolge bis zu 24 Proben pro Baum. Da der Dübel und die Scattered-Zone (Streu-Zone), welche vereinzelte, punktuelle Reaktionsbereiche darstellt, nicht bei allen Robinien vorhanden war, ergab sich im Schnitt eine Gesamtmenge von 160 zu testenden Bereichen. In folgender Tabelle 5 ist die Kennzeichnung der Zonen dargestellt.

Tabelle 5: Kennzeichnung der Zonen der verwendeten *Robinia pseudoacacia* Proben

Kennzeichnung der Zone	Bedeutung
C	Control
In	Inoculated
O	Callus-Zone
D	Decay-Zone
R	Reaction-Zone
S	Sound-Zone
Z	Scattered-Zone
Dü	Dübel
*	Zweites Eluat

Die Position der Zonen ist in Abbildung 8 dargestellt. Der Kallus (O) bildet die Überwallung am Wundrand und versucht diese zu schließen. Die Decay-Zone (Fäulnis-Zone) ist der Teil des Holzes, der vom Baum, wegen der Verletzung, nicht mehr gerettet werden kann. Dieser Teil wird sozusagen geopfert und ist aufgrund seines Abbauprozesses, durch eindringende Schadorganismen, dunkel verfärbt.

In der Reaction-Zone (Reaktions-Zone) findet, wie der Name vermuten lässt, die Abwehrreaktion des Baumes statt. Sie ist eine chemische Grenze, die das geschädigte, infizierte Holz vom gesunden abtrennt und somit die Ausbreitung der Fäule und der schädlichen Einflüsse reduziert. Sie stellt ein Hindernis für die Expansion von Pathogenen und Schäden dar.

Die Scattered-Zone (Streu-Zone) ist ein punktueller Reaktionsbereich, der dann auftritt wenn vom Baum keine durchgehende Reaction-Zone aufgebaut werden kann. Sie schließt an die Sound-Zone an, welche den gesunden Teil des Baumstammes angibt.

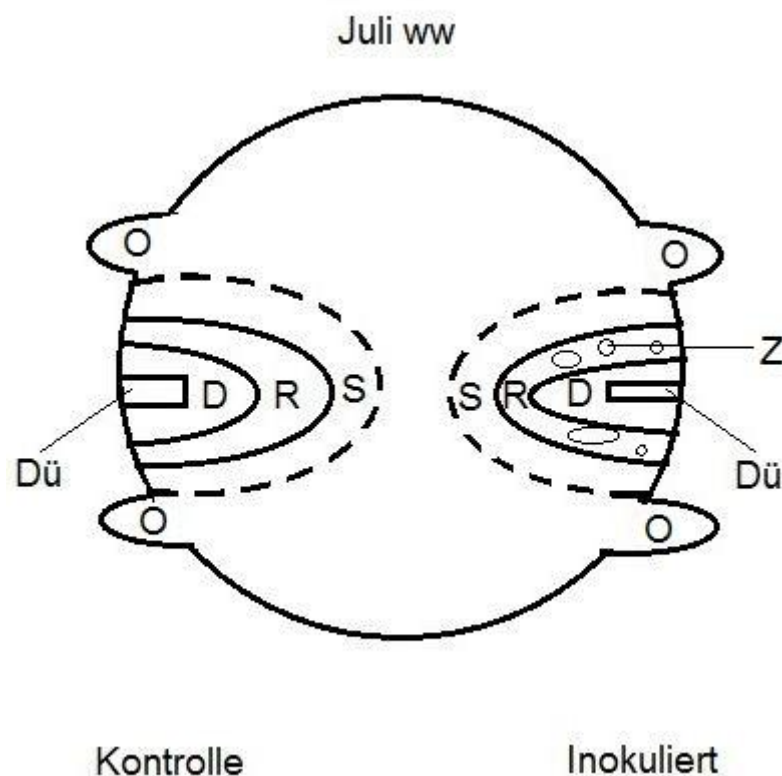


Abbildung 8: Grafische Darstellung des Querschnitts des Stammes der Robinie mit den jeweiligen Zonen Dü=Dübel, O=Callus, D=Decay-Zone, R=Reaction-Zone, S=Sound-Zone, Z=Scattered-Zone, ww=well watered, ws=water stressed.

Die verwendete Holzprobe *Robinia pseudoacacia* wurde zum Auftauen über Nacht in einen Exsikkator gelegt. Am Folgetag wurden die Proben zunächst unter UV-Licht untersucht, um die verschiedenen Zonen des Baumstammes zu ermitteln. Während des Abschottungsprozesses werden von *Robinia pseudoacacia* phenolische Phytoalexine (antibiotischer Abwehrstoff) gebildet. Dieser Phytoalexine aufbauende Prozess, basiert vornehmlich auf Flavonoiden, welche unter UV-Licht fluoreszieren (Lange et al., 2008).

Im Anschluss wurde von jeder Zone Probenmaterial, mittels Hornhautreibe, zu Holzmehl homogenisiert. Die immer tiefer liegenden Zonen wurden mit Hilfe von Hammer und Beitel freigelegt.

Die Geräte und Arbeitsflächen waren vor und nach der Benutzung abzuflammen bzw. zu desinfizieren. Dies diente der Vermeidung von Kontamination.

2.3.2 DNA-Extraktion

Für die DNA-Extraktion wurde das DNeasy Plant Kit der Firma Qiagen verwendet, (Tabelle 2). Isoliert wurde die DNA aus 60 mg Holzmehl.

Zu dem Holzmehl wurden je 600 µl AP1 zugegeben und mit Hilfe des Vortexers vermischt. Im Anschluss wurde die Probe für 10 Minuten in den Thermoblock bei 65°C gestellt. In diesem Schritt erfolgte die Zelllyse.

Dann wurden 200 µl AP2 zugegeben und erneut gevortext. Die Probe wurde für 5 Minuten bei – 20°C inkubiert, sodass Proteine und Zucker ausfallen konnten.

Die Probe wurde auf QIASHredder Säulen überführt und für 2 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt sorgte für die Entfernung der vorhandenen Zelltrümmer, welche sich als Pellet am Boden des Eppendorf Clip-Art Gefäßes ansammelten.

Im Anschluss wurden 500 µl der Probe in ein 2 ml Eppendorf Gefäß überführt. Hierbei war zu beachten, dass das Pellet nicht beschädigt wurde.

Es wurden 750 µl AP3, das mit Ethanol versetzt ist, hinzugefügt und vorsichtig gedreht und gerollt. Durch das Mischen dieser Zusammensetzung erfolgte die DNA Fällung.

Im darauffolgenden Schritt wurde die Probe auf DNeasyMiniSpin-Säulen überführt und bei 8.000 rpm 1 Minute zentrifugiert. So erfolgte die Bindung der DNA an die Säule.

Nach der Zentrifugation wurde das Filtrat verworfen und die Säule bzw. die DNA mit 500 µl AW1 für 30 Sekunden bei 8.000 rpm gewaschen. Nach dem Verwerfen des Filtrats wurde der Waschvorgang wiederholt.

Im nächsten Schritt wurde die Säule bei 13.000 rpm für 1 Minute trocken zentrifugiert und auf ein neues 1,5 ml Eppendorf Gefäß gesetzt.

Die Elution der DNA von der Säule kann mit unterschiedlichen Volumina des AE Puffers erfolgen. Das Volumen liegt bei 15 µl bis 100 µl, je nachdem was für ein DNA-Gehalt erwartet wird. Bei den durchgeführten Elutionen wurden 35 µl AE Puffer verwendet. Bei Raumtemperatur wurde 5 Minuten inkubiert, ehe bei 10.000 rpm für 1 Minute zentrifugiert wurde.

Die zwei Eluate wurden kurzzeitig bei – 4°C und langfristig bei – 80°C aufbewahrt.

2.3.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Bestimmung der Qualität und Quantität der DNA-Konzentration der Extrakte wird der Nanodrop 2000 der Firma Thermo Scientific verwendet. Mit Hilfe dieses Spektralphotometers kann der Erfolg der Extraktion überprüft werden und die DNA-Konzentration wird in einer Adsorptionskurve dargestellt.

Über die verarbeiteten Daten lässt sich nicht nur eine Aussage über die DNA-Konzentration erstellen, sondern auch über die Reinheit. Der Verlauf der Adsorptionskurve selbst zeigt auf den ersten Blick, ob, neben dem für DNA typischen-Maximum bei 260 nm, Abweichungen auftreten.

Über das Verhältnis der Adsorptionswerte von 260 nm zu 280 nm (OD_{260} zu OD_{280}) lässt sich die Verunreinigung der Probe durch zum Beispiel Proteine oder phenolische Komponente beschreiben. Bei reiner DNA liegt das Verhältnis bei etwa 1,8. Bei Verunreinigungen sinkt der Wert. Nucleinsäuren adsorbieren bei der Wellenlänge 260 nm, hier liegt somit das Maximum der Extinktion vor (Stephenson, 2005).

Bevor die Messungen erfolgen, muss der Spektralphotometer mit der Software am Computer verbunden werden. Im Anschluss werden 4 μ l PCR Wasser auf die Glasfläche im Strahlengang aufgetragen und etwa 5 Minuten Einwirkzeit berechnet. Dieser Schritt dient der Reinigung und schafft so optimale Voraussetzungen für die Messung.

Damit das Programm den Probenpuffer nicht mit einberechnet, wird ein Blankwert festgelegt. Dazu wird 1 μ l des verwendeten Probenpuffers aufgetragen und gemessen. Der Blankwert sollte nicht mehr als $\pm 0,04$ in der Absorption abweichen. Die Messung wird so oft wiederholt, bis der gewünschte Wert erreicht ist.

Für die Messung der Proben wird ebenfalls 1 μ l aufgetragen. Vorher sollten diese aber mit Hilfe des Vortexers gut durchmischt werden. Zwischen den Messungen werden die Glasflächen im Strahlengang des Messgerätes mit einem weichen Tuch gereinigt. Und nach etwa 10 Messungen in Folge wird der Blankwert neu kalibriert.

Nach dem Durchlauf der Messungen wird das Spektralphotometer gereinigt, indem erneut 4 μ l PCR Wasser auf die Glasoberflächen pipettiert werden und einwirken.

2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Chain-Reaction ermöglicht die Vervielfältigung (Amplifikation) von bewusst ausgewählten DNA Abschnitten. Die Menge an Nucleinsäure kann sehr gering sein (1 pg - 500 ng) und kann aus den unterschiedlichsten Ausgangsmaterialien bestehen. Bei der PCR handelt es sich um eine exponentielle Vermehrungsrate (Müller, 2001).

Die Polymerase-Ketten-Reaktion folgt prinzipiell in drei Schritten ab:

1. Denaturierung
2. Annealing
3. Elongation

Denaturiert wird bei 94°C, dabei trennen sich die zwei Stränge der Ausgangs-DNA (Template). Es ist zu beachten, dass eine vollständige Denaturierung sehr wichtig für den Erfolg der PCR ist. Wird der DNA-Doppelstrang nicht komplett aufgetrennt, führt dies zu einer deutlichen Absenkung der Annealing-Effizienz des Oligonucleotides. Aus diesem Grund sollte dieser Schritt zu Beginn der PCR für 1 bis 5 Minuten erfolgen. Während der Zyklen reichen für den Denaturierungsschritt wenige Sekunden aus.

Die Temperatur wird auf ca. 55°C gesenkt, sodass es zur Hybridisierung der vorhandenen Oligonucleotidprimer an die einzelsträngige Template-DNA kommt. Daher muss für jeden Primer, der etwa 20 bp umfasst, die optimale Schmelztemperatur berechnet werden (Clark und Pazdernik, 2009). Werden die zwei Temperaturen nicht aufeinander abgeglichen, treten generell folgende Probleme auf:

- Zu hohe Temperatur: kein Annealing und damit kein PCR Produkt
- Zu niedrige Temperatur: Fehlpaarungen und damit unspezifische PCR Produkte

Bei der Elongation wird die Temperatur auf 72°C erhöht. Das ist das Optimum für die thermostabile Taq-Polymerase. Während diesem Schritt wird der Primer verlängert, bis wieder ein DNA-Doppelstrang vorliegt, welcher der ursprünglichen Ausgangs-DNA exakt gleicht. Die Elongationszeit muss an die Länge der zu amplifizierenden DNA-Matrize angepasst werden. Ist die Zeit zu kurz, kann die Taq-Polymerase den Doppelstrang nicht vervollständigen. Ist sie zu lang, bleibt der Polymerase zu viel Zeit für Fehlelongation. Die Faustregel besagt: Etwa 60 sek. für 1000 bp.

Während eines Experiments können diese drei Schritte in der Regel 35 bis 40 Mal wiederholt werden. Wie bereits erwähnt nimmt die Anzahl der Kopien der eingesetzten DNA exponentiell zu, sodass am Ende 2^n Kopien des gesuchten DNA-Fragments vorliegen. Das n im Exponenten steht dabei für die Anzahl der Zyklen (Lodish et al., 2001).

Die PCR wurde mit Hilfe des Taq Core Kits von Qiagen durchgeführt (Tabelle 2). In nachfolgender Tabelle 6 sind die Komponenten für einen Mastermix für eine Probe aufgeführt.

Tabelle 6: PCR-Mastermix-Ansatz für eine Probe mit dem Taq Core Kit von Qiagen

Komponente (Konzentration)	Volumen [µl]
Bidest	7,775
Q-Solution	2,5
10x Reaktionspuffer	1,25
dNTP Mix (10 mM/dNTP)	0,25
Primer for (100 pmol/µl)	0,075
Primer rev (100 pmol/µl)	0,075
Taq-Polymerase (5 units/µl)	0,075
Gesamtvolumen	12

Der Mastermix-Ansatz von 12 µl wird für jede Probe verwendet. Hinzu pipettiert wird ein Template von 0,5 µl (bei den verwendeten Proben entsprechend einer Menge von 3 - 250 ng DNA). Zusätzlich werden eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt, um den Erfolg der PCR bzw. Kontaminationen zu erfassen. Die Negativkontrolle beinhaltet den Mastermix-Ansatz aber kein Template und die Positivkontrolle enthält den Mastermix-Ansatz, sowie 0,5 µl Template.

Das in Tabelle 7 aufgeführte Programm ist das Standard-Programm für die häufig genutzten Primer ITS1.1/ITS4.

Tabelle 7: PCR-Programm für die Primer ITS1.1/ITS4

	Schritt	Temperatur	Zeit
	Vorheizen	94°C	variabel
	Anfangs-Denaturierung	94°C	4 min.
40 Zyklen	Denaturierung	94°C	30 sek.
	Annealing	55°C	30 sek.
	Elongation	72°C	45 sek.
	End-Elongation	72°C	7 min.
	Lagerung	4°C	variabel

Die für die PCR gebrauchten und nicht neu erstellten Primer sind in Tabelle 8 in Bereiche der ITS-Region, Sequenz und jeweilige Schmelztemperatur, gegliedert. Die gesamte ITS-Region lässt sich mit dem Primerpaar ITS1.1/ITS4 amplifizieren.

Die Pilzsequenz dagegen lassen sich mit dem Primer Pilzfor 1 und Pilzrev 1 amplifizieren. Diese binden an den hoch konservierten Bereich 5,8S, in welchem die Sequenz für alle Pilze identisch ist.

Tabelle 8: Darstellung der Amplifikationsbereiche mit den zugehörigen Primer und Schmelztemperatur

Bereich	Primerart	Primername	Sequenz	Schmelztemperatur
18S	Forward Primer	ITS1.1	GAACCTGCGGAAGGATCAT	56,7°C
26S	Reverse Primer	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	55,3°C
5,8S	Forward Primer	Pilzfor 1	AACTTTCAACAACGGATCTCTT	54,7°C
5,8S	Reverse Primer	Pilzrev 1	AAGAGATCCGTTGTTGAAAGTT	54,7°C

2.3.5 Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR, welche ein Verfahren zur Quantifizierung darstellt, wird genutzt um kleinste Mengen von *Armillaria mellea* in den Proben zu detektieren. Da die quantitative Real-Time-PCR im Vergleich zur PCR sensitiver ist, prüft diese die gewonnen PCR Resultate auf mögliche Unstimmigkeiten.

Die qRT-PCR basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion und ist somit eine Vervielfältigungsmethode für Nucleinsäuren. Ferner bietet sie die Möglichkeit der Überprüfung der Quantifizierung in Echtzeit.

Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende oder während eines PCR-Zyklus durchgeführt, dabei ist die Nutzung von DNA-Farbstoffen z.B. Ethidiumbromid oder SYBR Green I notwendig. Diese Fluoreszenzfarbstoffe interkalieren an die DNA bzw. binden an doppelsträngige DNA, wodurch bei entsprechender Bestrahlung die Fluoreszenz dieser Farbstoffe stark ansteigt (Holzapfel und Wickert, 2007).

Die Interkalation von SYBR Green I findet ausschließlich an doppelsträngiger DNA statt. Bei einzelsträngiger DNA bleibt dieser Prozess erfolglos. Ungebunden in Lösung zeigt SYBR Green I wenig Fluoreszenz, strahlt jedoch ein starkes Fluoreszenzsignal bei der Bindung an doppelsträngige DNA aus. Ein Anstieg des Fluoreszenzsignals tritt somit während der Polymerisation auf und verringert sich wenn es zu Denaturierung der DNA kommt (Arya^f et al., 2005).

Dies bedeutet, dass die Zunahme der Amplifikate mit einer Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus korreliert. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist die geringe Spezifität, da auch unspezifische PCR-Produkte bzw. Nebenprodukte wie z.B. Primer-Dimere diese Farbstoffe einlagern können. Um die Spezifität der Amplifikate bestimmen zu können, muss nach abgelaufener Real-Time-PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden.

Während einer Schmelzkurvenanalyse wird die DNA „aufgeschmolzen“, indem bei kontinuierlicher Fluoreszenzmessung die Temperatur im Real-Time-PCR-Gefäß langsam und kontinuierlich erhöht wird (z.B. bis 95°C mit einer Heizrate von 0,1-10°C/sek.) (Ririe et al., 1996).

Bei einer für das spezifische Amplifikat charakteristischen Schmelztemperatur wird der DNA-Doppelstrang wieder in zwei einzelsträngige Moleküle aufgetrennt. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und somit eine Fluoreszenzabnahme detektiert. Da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt aufweist als unspezifische, kürzere Amplifikate, ist eine Unterscheidung möglich.

In Tabelle 9 ist der 14,55 µl Mastermix-Ansatz (Stratagene) für die Real-Time-PCR aufgezeigt. Die Angaben hier beziehen sich auf die Menge für eine Probe. Das Proben-Template zählt nicht zu dem Mastermix-Ansatz, sondern wird im Anschluss hinzugefügt.

Tabelle 9: Real-Time-PCR-Mastermix-Ansatz für eine Probe

ddH ₂ O	3,825 µl
Stratagene Mix	7,5 µl
Primermix (Endkonz. je 0,3 µM)	3 µl
Rox (Endkonz. 30 nM)	0,225 µl
Template	0,445 µl

2.3.6 Gelelektrophorese von DNA – Agarosegel

Die Gelelektrophorese ist eine der wichtigsten Methoden zur Analyse von DNA. Die schnelle Durchführung, das Benötigen geringster Mengen an Material, sowie der schnelle und kostengünstige Nachweis der Nucleinsäure im Gel zählen zu ihren Vorteilen.

Mit Hilfe der Gelelektrophorese lassen sich DNA-Fragmente der Größe nach auftrennen. Hierbei wird sich zu Nutze gemacht, dass unterschiedlich lange, geladene DNA Fragmente im elektrischen Feld unterschiedlich weit wandern. Voraussetzung ist die gleiche Zeitspanne während der Gelelektrophorese.

Die Auftrennung der DNA erfolgt in einem elektrischen Feld innerhalb eines festen Trägermaterials. Die DNA ist innerhalb eines großen pH-Bereichs stets negativ geladen. Dies liegt an den negativ geladenen Phosphatgruppen des Zucker-Phosphat-Gerüsts der Nucleinsäure. Daraus folgt, dass die Wanderung der DNA in Richtung Anode relativ pH-unabhängig ist.

Die DNA besitzt eine gleich bleibende Ladungsdichte, d.h., das Verhältnis von Molekulargewicht zur Ladung ist stets konstant. Die Wandergeschwindigkeit im elektrischen Feld und in freier Lösung ist ungeachtet des Molekulargewichts gleich groß. Erst im Gel unterscheiden sich die Wandergeschwindigkeiten von Nucleinsäuren, die durch verschiedene Molekülgrößen bewirkt wird. Weiter hängt die Wandergeschwindigkeit von der Agarosekonzentration, der angelegten Spannung und der Art des Laufpuffers ab.

Als Trägermaterial wird Agarose verwendet, welches aus roten Meeresalgen gewonnen wird. Dabei handelt es sich um ein Polymer, das aus verschiedenen verknüpften Galactoseeinheiten besteht. Die Vorteile der Agarosegele liegen darin, dass sie ungiftig sind, einfach herzustellen und ideal zur Trennung von hochmolekularen Proteinen über 500 kDa sind. Die Agarosegele sind relativ großporig: 150 nm Porengröße bei 1% bis 500 nm bei 0,16%.

Die Konzentration der Agarose im Puffer richtet sich nach der Größe der mit der Gelelektrophorese aufzutrennenden Teilchen, wobei für kleinere Partikel eine bessere Trennung (räumliche Auflösung) mit einem höherprozentig angesetzten Agarosegel erzielt werden kann – für größere mit einem niederprozentigen Gel.

Für die Gelelektrophorese wird ein 2,5 %-iges Agarosegel eingesetzt. Hierzu werden 1,25 g Agarose in 50 ml 0,5x TAE-Puffer (20 mM TRIS, 10 mM Acetat, 0,5 mM EDTA) in der Mikrowelle aufgekocht, bis die Lösung homogen ist. Das heiße flüssige Gel wird in eine vorbereitete Gießapparatur mit Gelschlitten sowie einem Gelkamm gegossen. Der Gelkamm bestimmt die Anzahl und Größe der Geltaschen.

Nach etwa 20 Minuten kann das fest gewordene Agarosegel aus der Gießapparatur entnommen und in die Gelelektrophoresekammer gelegt werden. Diese ist mit Gelelektrophoresepuffer (0,5x TAE, s.o.) gefüllt und muss das Gel vollständig bedecken.

Auf einem Stück Parafilm werden ca. 0,5 µl Ladepuffer (0,25 % Bromphenolblau, 30 % Glycerin) und 2,5 µl der zu untersuchenden PCR-Produkte miteinander vermengt. Der Ladepuffer dient in erster Linie dazu, die Dichte der DNA-Lösung zu erhöhen (30% Glycerin), sodass die Lösung beim Auftragen in die Taschen des Gels absinkt und nicht in den Laufpuffer diffundiert.

In eine Tasche neben der Proben wird ein 100 Basenpaar (bp) Marker namens GelPilot 100 bp plus der Firma Qiagen mitgeführt (Abbildung 9), welcher ein wichtiges Hilfsmittel zur Charakterisierung der Fragmentgrößen ist. Mit diesem Marker (Längenstandard) erfolgt die Größenbestimmung der DNA-Fragmente.

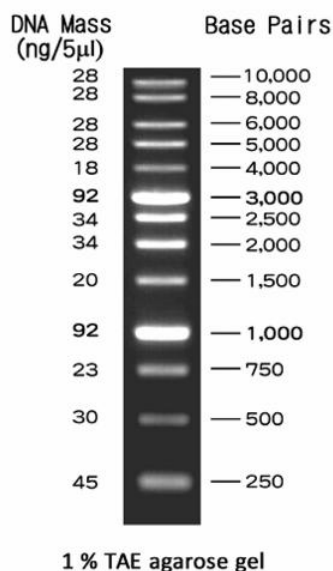


Abbildung 9: Größenmarker der Agarose-Elektrophorese (Quelle: NIPPON Genetics).

Die hier eingesetzte Spannung zur Auftrennung der Fragmente beträgt 135 V für 30 Minuten.

Der letzte Arbeitsschritt ist die Visualisierung der DNA-Bandenmuster durch den Einsatz des Farbstoffes Ethidiumbromid. Das Gel wird zunächst aus der Elektrophoresekammer genommen und für etwa 2 Minuten in eine Ethidiumbromidlösung (0,00015 %) überführt und geschwenkt. Während dieser Zeit interkalieren Ethidiumbromid-Moleküle zwischen die Basen der DNA bzw. RNA, welche unter UV-Licht fluoreszieren (Clark und Pazdernik, 2009). Um überschüssigen Farbstoff zu entfernen wird das Gel für etwa 20 Minuten im Wasserbad entfärbt. Die Geldokumentation erfolgt unter UV-Licht am GelDoc der Firma Bio-Rad Laboratories. Dieses Bild wird gescannt und gespeichert, sodass die Ergebnisse für weitere Auswertungen und späteres Interesse digitalisiert vorliegen.

2.3.7 Aufreinigung der PCR Produkte

Das Ziel der Aufreinigung der PCR Produkte ist diese von Enzymen, Nucleotiden und Salzen zu trennen. Dies ist eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Sequenzierung.

Verwendet wird das QIAquick PCR Purification-Kit der Firma Qiagen. Es wird gemäß den Herstellervorgaben eingesetzt, das wie folgt protokolliert ist:

Im ersten Schritt wird dem PCR-Produkt das 5-fache Volumen PBI zugeführt. Hierfür müssen die verwendeten Mengen aus den vorhergegangenen Methoden bekannt sein. Für die PCR wurden 12 µl Mastermix und 0,5 µl Template verwendet. Für die anschließende Gelelektrophorese wurden 2,5 µl aus dem PCR Reaktionsgefäß entnommen. Am Ende bleiben somit 10 µl PCR-Produkt im Reaktionsgefäß.

Im nächsten Schritt wird die Lösung auf die Säule aufgetragen und für 30 Sekunden bei 8.000 rpm zentrifugiert. Dabei wird die amplifizierte DNA auf die Säule gebunden.

Um die Ausbeute zu erhöhen, wird nach der Zentrifugation das Filtrat erneut auf die Säule aufgegeben und es erfolgt eine weitere Zentrifugation der Säule für 30 Sekunden bei 8.000 rpm. Das Filtrat wird verworfen.

Es folgen zwei Waschschrte der Säule. Dafür werden 600 µl PE Puffer, der mit Ethanol versetzt ist, auf die Säule pipettiert – jeweils für 30 Sekunden bei 8.000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wird verworfen.

Hinterher wird die Säule für 1 Minute bei 13.000 rpm trocken zentrifugiert und anschließend auf ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt.

Die Eluation erfolgt mit etwa 35 µl EB Puffer. Die eingesetzte Menge hängt von der Stärke der Ausgangsbande ab. Da für die Sequenzierung ein Gesamtvolumen von 30 µl benötigt wird, erweist sich eine Menge von 35 µl EB Puffer als sinnvoll, da ca. 2 bis 3 µl auf der Säule verbleiben und geringe Mengen beim pipettieren in den Pipettenspitzen zurückbleiben.

Zuletzt wird die Säule bei Raumtemperatur für 2 Minuten inkubiert und ein letztes Mal für eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert, bevor die Lagerung bei 4°C erfolgt.

2.3.8 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung ist eine Methode zur Bestimmung der Basensequenz eines DNA-Abschnittes. Durch diese lassen sich die Proben mit Sequenzen aus der Datenbank vergleichen und geben so Aufschluss über die vorhandene DNA. Die Sequenzierung der aufgereinigten Proben erfolgte extern bei der Firma Eurofins MWG Operon. Bevor die Proben verschickt werden konnten, mussten sie wie folgt vorbereitet werden:

Das Eluat, aus dem Schritt „Aufreinigung der PCR Produkte“ (Kapitel 2.3.7), welches in etwa 30 µl beinhaltete, wurde gleichmäßig auf zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Der Grund dafür ist, dass zwei Sequenzierungsreaktionen durchgeführt werden. Einmal aus Richtung des forward-Primers und einmal aus Richtung des reverse-Primers.

Weiter müssen pro Sequenzierung die jeweils verwendeten for- und reverse-Primer in einer Konzentration von 10 pmol/µl mitgeliefert werden. Gelagert wird alles bei 4°C.

Die Ergebnisse werden per Computer elektronisch übermittelt. Die erhaltenen Dateien enthalten die reinen Sequenzdaten, sowie die Chromatogramme der Sequenzierungsreaktionen. Genauer untersuchen kann man diese mit dem Programm Adobe Reader oder Chromas Lite. Mit Hilfe dieser Darstellung, gibt das Chromatogramm erste Angaben zu der Qualität der Sequenzierung an. Es wird grafisch dargestellt, ob es sich um saubere oder überlappende Sequenzen handelt. Im Falle einer Überlagerung, wird die Base mit dem dominierendem Signal angezeigt.

Die Analyse der Dateien erfolgt mit dem Programm MEGA5. Eine weitere Hilfe bietet die Online-Sequenzdatenbank BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Die Sequenzdatenbank ermöglicht es, die eigenen sequenzierten Proben mit Sequenzen aus der Datenbank abzugleichen. Der Abgleich dient als Richtlinie. Es werden Sequenzen angegeben die der Eigenen sehr stark, bis weniger stark ähneln. Nicht in jedem Fall findet BLAST eine hohe Übereinstimmung mit der gesuchten Sequenz. Dennoch werden verwandte Arten angegeben, die den eigenen Sequenzen ähneln und so als Orientierung genutzt werden können.

Ebenfalls kann man mit diesem Werkzeug ermitteln, ob es sich bei der sequenzierten Probe um die gesuchte Art bzw. um welche Art es sich überhaupt handelt.

Die Analyse erfolgt mit MEGA5. Unter Zuhilfenahme des ClustalX-Algorithmus (Larkin, 2007) können Sequenzen automatisch aneinander ausgerichtet werden. Um die Sequenzen der zwei Sequenzierungsreaktionen abzugleichen, muss bei der Sequenz die mit dem reverse-Primer erstellt worden ist, darauf geachtet werden, dass sie invertiert und komplementiert wird.

2.3.9 Entwicklung der Taxon-Primer

Als Taxon (Plural Taxa) bezeichnet man in der Biologie eine systematisch benannte Gruppe von Lebewesen. Ist z.B. die Sequenz der ITS-Region von *Armillaria mellea* bekannt, können spezifische Oligonukleotid-Primer (Taxon-Primer) an diese binden, amplifizieren und so zur Identifizierung des Pilzes beitragen.

Je umfangreicher die Sequenzdatenbank ist bzw. die Sequenzen der betreffenden Art sind, mit der man arbeitet, desto spezifischer und sicherer kann die Entwicklung des gewünschten Primer erfolgen.

Für die Entwicklung der Primer achtet man zwischen den Sequenzen auf Abweichungen in der Basenabfolge. Dabei ist es wichtig, dass der Primer eine Länge von etwa 18 bis 25 bp besitzt und sich mindestens zwei Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP, englisch Single Nucleotide Polymorphism, einzelne abweichende Basen) in diesem Bereich befinden.

Weitere Kriterien, die bei der Erstellung der Primer beachtet werden müssen, sind die sich oft wiederholende Nucleotide bzw. Dinucleotide (Repeats). Ihr Vorhandensein in einem Primer ist unvorteilhaft, da dadurch die Spezifität des Primer geschwächt werden kann. Auch der Gehalt an Guanin und Cytosin sollte nicht über 60 % liegen. Denn aufgrund ihrer starken Wechselwirkung, welche auf die drei Wasserstoffbrückenbindungen beruht, führt schon eine geringe Länge zu einem hohen Schmelzpunkt der Primer.

Sequenzbedingt können nicht alle Bedingungen erfüllt werden, sodass in Einzelfällen Annäherungen eingegangen werden müssen, was bedeutet, dass ebenfalls Primer geringerer Qualität in Betracht gezogen werden müssen.

Die ausgewählten Primer-Sequenzen werden auf der Homepage der Firma Eurofins MWG Operan (www.mwg-biotech.com), wo die Möglichkeit der Analyse von Oligonucleotiden besteht, genauer auf ihre Eignung untersucht. Das dort vorhandene Programm Property-Check, berechnet die Schmelztemperatur der Primer-Sequenzen, welche mindestens bei 54°C liegen sollte (Dieffenbach et al., 1993).

Bei der Kombination von verschiedenen Primer zu einem Primerpaar, sollte darauf geachtet werden, dass ihre Schmelztemperaturen nicht mehr als 5°C auseinander liegen (Sambrook und Russell, 2001). Kleinere Anpassungen an die Schmelztemperatur können durch das Hinzufügen oder Weglassen einzelner außenstehender Basen an der Primer-Sequenz vorgenommen werden. Hier ist zu beachten, dass die Basen Guanin und Cytosin einen weitaus höheren Einfluss auf das Schmelzverhalten haben, als die Basen Adenin und Thymin.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Kompartimentierung

Die Kompartimentierung ist Inhalt des CODIT-Modells und beschreibt die räumliche Abschottung des toten oder infizierten Gewebes vom gesunden. Nach Verwundungen und Infektionen dient dieser Vorgang der Pathogenabwehr im sekundären Xylem, wodurch die Funktion des gesunden Holzes geschützt und die Ausbreitung der Schadorganismen eingedämmt werden soll (Shigo, 1984).

Eine wesentliche chemische Abwehrreaktion des Baumes gegen Krankheitserreger ist das Anreichern von antimikrobiell wirksamen Phenolen in den Zellen des Gewebebereiches, die zur dunklen Verfärbung führt (Witzel und Martin, 2008). Direkt am Wundrand sind solche Verfärbungen im Gewebe zu finden, die auf Zersetzungserscheinungen hindeuten. Dieser Bereich wird als Fäulnis-Zone bzw. Decay-Zone bezeichnet.

Angrenzend an diese Zone ist eine weitere, leichtere Verfärbung zu erkennen, welche unter UV-Licht klarer zu detektieren ist, da sie gelb-grün leuchtet (Abbildung 10). In der Nähe der Infektionsstelle kommt es zu Einlagerungen von Phytoalexinen. Dadurch wird weiterhin die Funktionalität des Gewebes unter gleichzeitiger Eindämmung der Ausbreitung der schädlichen Mikroorganismen aufrecht erhalten. Der Phytoalexin-aufbauender Prozess basiert vornehmlich auf Flavonoiden, die unter UV-Licht fluoreszieren (Magel et al., 2007).

Durch die Fluoreszenz in dieser Reaktionszone wird im Querschnitt eine deutliche Grenzzone erkennbar. Die Reaktions-Zone geht sogar in das Kernholz über. Weiter breitet sie sich nicht nur tangential, sondern auch ober- und unterhalb zur Wunde aus (Abbildung 11).

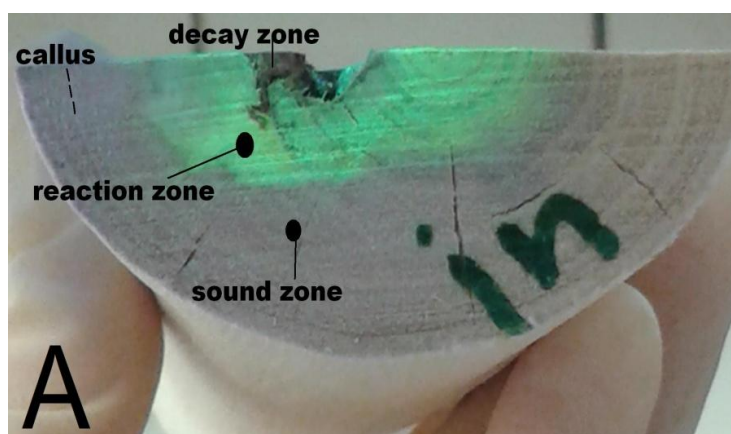


Abbildung 10: Verfärbungsreaktion des künstlich infizierten Stammes der Robinie #10 ww Juli mit *Armillaria mellea*. In der Reaction-Zone werden Flavonoide eingelagert, die unter UV-Licht fluoreszieren.

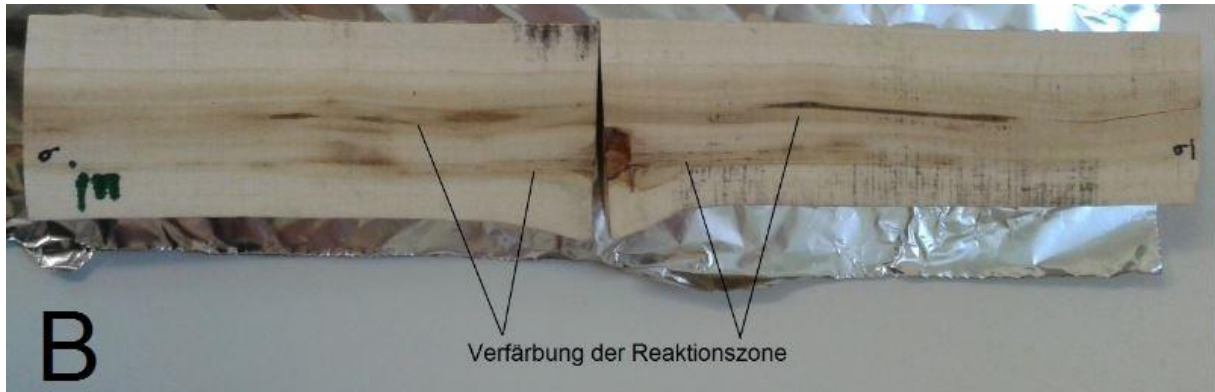


Abbildung 11: Längsschnitt des künstlich infizierten Stammes der Robinie # 10 ww Juli. Deutliche Verfärbung der Reaktionszone auch ohne UV-Licht zu erkennen.

Nach Shortle und Smith (1990) sind die phenolischen Verbindungen in der Fäulniszone vergleichbar mit denen des Kernholzes, abgesehen von der Aussetzung oxidativer Prozesse. Die Vermutung ist, dass nekrotisierendes Gewebe der Fäulniszone ähnliche Inhaltsstoffe wie die Reaktionszone bildet, mikrobiell jedoch noch nicht zersetzt aber oxidiert vorliegt. So färbt sich auch verletztes Kernholz dunkler und verliert die Fluoreszenz nach Verletzung und in längerem Kontakt mit der Luft.

Die Kompartimentierung ist nicht das Hauptziel dieser Arbeit, dennoch lassen sich in Bezug auf den Kallus und der Reaktions-Zone Unterschiede feststellen, die in Tabelle 10 dargestellt sind. Exemplarisch dafür, wurden vier unterschiedliche Robinien einander gegenübergestellt (#3 ws Feb., #8 ws Jul., #4 ww Feb., #10 ww Jul.).

Tabelle 10: Übersicht der Ergebnisse der Kompartimentierung der Robinienproben. Hier exemplarisch an den Proben #3 ws Feb., #8 ws Jul., #4 ww Feb., #10 ww Jul. zusammengefasst. ww=well watered, ws=water stressed

		Inokuliert		Kontrolle	
		Kallus	Reaktions-Zone	Kallus	Reaktions-Zone
ws	Februar	- (schwach)	- (schwach)	- (schwach)	- (schwach)
ws	Juli	- (schwach)	+ (stark)	- (schwach)	+ (stark)
ww	Februar	+ (stark)	- (schwach)	- (schwach)	- (schwach)
ww	Juli	+ (stark)	+ (stark)	- (schwach)	+ (stark)

In den Kontrollproben erfolgte nur eine schwache Kallusbildung, unabhängig davon, ob die Robinienproben gut bewässert (ww) oder trockengestresst (ws) waren. Die Entwicklung der Reaktions-Zone war in den im Sommer inokulierten Proben (Jul.) deutlicher ausgeprägter, als in den im Winter (Feb.) inokulierten Robinien.

Bei den inokulierten Robinien zeigte sich vor allem in den gut bewässerten Bäumen eine gute Ausbildung des Kallus'. Dabei war die Bildung unabhängig vom Inokulationszeitraum, denn bei den trockengestressten Bäumen war nur ein schwacher Kallus zu sehen. Die Ausprägung der Reaktions-Zone war in den Robinien, die im Winter (Feb.) mit dem Pilz infiziert wurden, deutlich schwächer. In den Proben aus der Sommerinokulation (Jul.) war die Reaktions-Zone in Bezug auf ihre Ausbildung wesentlich intensiver.

Erkennbar ist, dass in diesem Zusammenhang der Trockenstress einen geringeren Einfluss auf die Bildung der Reaktions-Zone einnimmt, als der klimatische Zeitpunkt der Infektion. Denn eine gut ausgebildete Reaktions-Zone war in den künstlich infizierten Robinien im Februar bei guter und schlechter Wasserversorgung zu Stande gekommen.

Dieser visuelle Vergleich zwischen trockengestressten und gut bewässerten sowie im Winter und Sommer infizierten Robinien, liefert jedoch keine aussagekräftigen Erkenntnisse über das Vorkommen von *Armillaria mellea* in den Proben.

3.2 Überprüfung der DNA-Extraktion mittels NanoDrop 2000

Die Messung der DNA-Konzentration (2.3.3) und die Ermittlung der Reinheit der DNA-Extrakte aller *Robinia pseudoacacia* und *Armillaria mellea* Proben erfolgte mittels spektralphotometrischer Analyse am NanoDrop 2000. Dabei wurden die Proben einer Baumnummer zurzeit extrahiert, um Kontaminationen unter den verschiedenen Baumnummern zu vermeiden, die zu fälschlichen Ergebnissen führen könnten.

Die Herstellung der DNA-Extrakte ist im Abschnitt 2.3.2 erklärt. Bei allen Extraktionsproben war das Ausgangsmaterial ein Stück eines Baumstammes der jeweiligen Baumnummer. Neben dem Messen der DNA-Konzentration wurden Adsorptionsverhältnisse ermittelt, die Rückschluss auf die Reinheit der Extrakte zuließen. Die Absorptionskurven zeigten die gemessenen Absorptionen der Extrakte gegen die Wellenlänge (Abbildung 12). In Tabelle 11 sind die ermittelten Werte mittels NanoDrop 2000 beispielhaft für die Zonen des Baumes #9 ws Juli aufgezeigt.

Tabelle 11: der spektralphotometrischen Analyse mittels NanoDrop 2000. Hier handelt es sich um *Robinia pseudoacacia* Baum #9 ws Juli. In = Inoculated, C = Control, R = Reaction Zone, D = Decay Zone, O = Callus, S = Sound Zone

Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230
blank	0,1	ng/μl	0,002	0,010	0,20	0,12
In R	205,0	ng/μl	4,099	2,302	1,78	1,19
In R*	13,0	ng/μl	0,261	0,128	2,03	4,26
In D	342,9	ng/μl	6,858	3,602	1,90	1,44
In D*	18,7	ng/μl	0,374	0,196	1,91	2,64
In O	666,0	ng/μl	13,319	6,360	2,09	2,26
In O*	99,5	ng/μl	1,990	0,997	2,00	2,36
In S	167,4	ng/μl	3,347	1,715	1,95	1,93
In S*	22,8	ng/μl	0,455	0,223	2,04	3,31
C D	112,4	ng/μl	2,247	1,197	1,88	1,89
C D*	23,8	ng/μl	0,475	0,241	1,97	3,07
C O	701,2	ng/μl	14,024	7,343	1,91	1,81
C O*	40,1	ng/μl	0,802	0,402	1,99	2,87
C S	320,0	ng/μl	6,399	3,167	2,02	2,23
C S*	53,1	ng/μl	1,062	0,515	2,06	2,94
C R	72,6	ng/μl	1,452	0,721	2,01	3,36
C R*	16,3	ng/μl	0,327	0,144	2,27	32,54

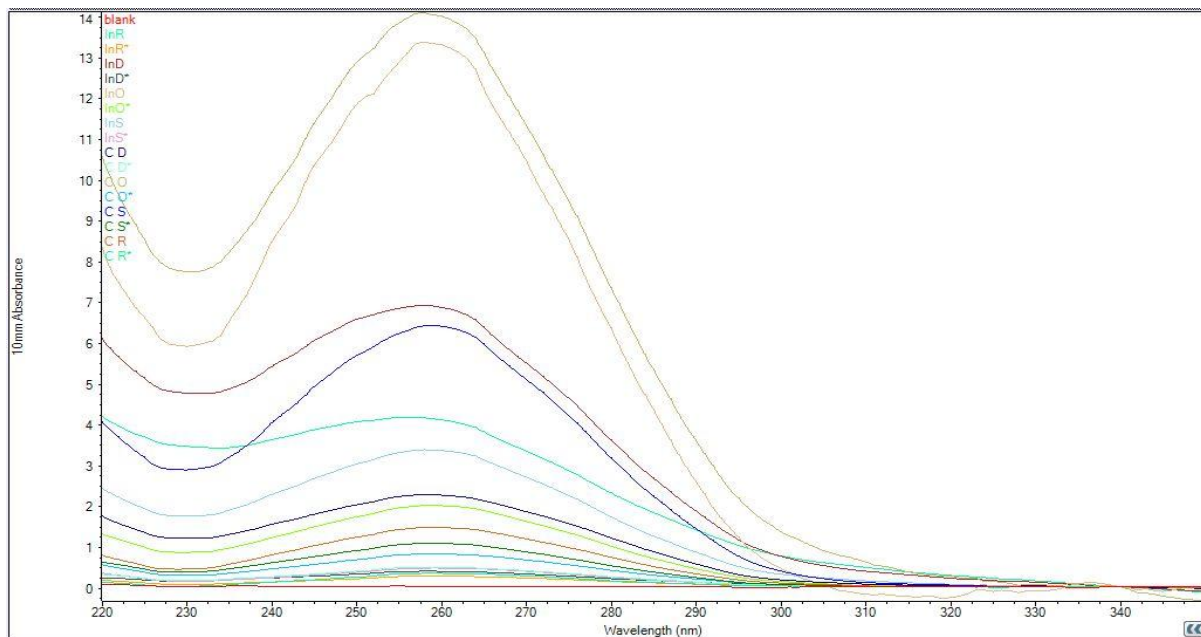


Abbildung 12: Darstellung der Absorption aufgetragen gegen die Wellenlänge in nm am Beispiel der Baumprobe #9 ws Juli. Die Kurven zeigen alle einen Absorptionspeak bei 260 nm.

Die Konzentrationen der ersten Eluate unterscheiden sich stark untereinander und variieren um etwa das 10-fache. Die Werte reichen von einer Konzentration von 72,6 ng/μl bis hin zu einer Konzentration von 701,2 ng/μl.

Die Konzentrationen der zweiten Eluate liegen deutlich unter denen der ersten Eluate. Die Konzentrationswerte reichen von etwa 13,0 ng/μl bis maximal 99,5 ng/μl, wodurch der Konzentrationsumfang um etwa das 8-fache variiert.

Aus dem Vergleich zwischen dem ersten Eluat und niedriger konzentriertem zweiten Eluat, lässt sich deuten, dass der größere Teil an DNA während des ersten Eluationschrittes der Extraktion von der Säulenmatrix eluiert wurde. Somit konnten beim zweiten Eluationsschritt nur geringere Mengen an DNA gewonnen werden.

Der Grund für die stark variierenden Werte innerhalb des ersten oder zweiten Eluationsprozesses, liegt daran, dass die meiste DNA während der ersten Eluation von der Säule gewaschen wurde und somit im zweiten Waschschrift deutlich weniger DNA eluiert wird.

Das Absorptionsmaximum der 16 gemessenen Proben liegt wie erwartet bei 260 nm, da Nucleinsäuren bei diesem Wert absorbieren. Hinsichtlich des Verhältnisses 260/280, welches die Reinheit der DNA beschreibt, lagen die Werte aller Eluate zwischen 1,78 und 2,27. Dies deutet auf einen hohen Reinheitsgrad der DNA in den jeweiligen Proben hin, auch wenn die gemessenen Werte um bis zu 0,4 abweichen.

Zur weiteren Anwendung eignen sich alle getesteten Proben, da für die PCR die verwendeten Proben eine Konzentration von etwa 20 ng/μl vorweisen sollten.

3.3 Erstellung der Taxon-Primer

Die Erstellung der spezifischen Taxon-Primer ist für die Identifizierung von *Armillaria mellea* unerlässlich. Denn nur diese können bzw. sollen signifikant an die DNA dieses Pilzes binden und amplifizieren. Um die optimale Primer-Kombination zu ermitteln, die eine hohe Spezifität zu *A. mellea* aufweist, wurden verschiedene forward- und reverse-Primer erarbeitet und getestet.

Wie in 2.3.9 beschrieben, wurden die Sequenzen der *Armillaria mellea* Stämme miteinander verglichen. Dabei wurde nach Stellen gesucht in denen sich die Basenabfolgen voneinander unterscheiden – in mindestens zwei Bereichen. Passende Möglichkeiten wurden herausgearbeitet und einer anschließenden genaueren Überprüfung unterzogen. In Abbildung 13 ist die Position der erarbeiteten Optionen gekennzeichnet.

CLUSTAL X (1.81) MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT

	Amtaxfor 1	Amtaxfor b	
Armillaria mellea	TGTTGCTGACC-TGTTAA-AGGGTATGTGACCGT-CGAAAGT-TTACGCTTCTGTCGAAAGC-ACCCTGTGCACCTTTG-T		77
FJ875692.1 Armillaria mellea	TGTTGCTGACC-TGTTAA-AGGGTATGTGACCGT-CGAAAGT-TTACGCTTCTGTCGAAAGC-ACCCTGTGCACCTTTG-T		77
FJ784173.1 Armillaria mellea	-----FA-AGGGTATGTGACCGT-CGAAAGT-TTACGCTTCTGTCGAAAGC-ACCCTGTGCACCTTTG-T		72
FJ784172.1 Armillaria mellea	TGTTGCTGACC-TGTTAA-AGGGTATGTGACCGT-CGAAAGT-TTACGCTTCTGTCGAAAGC-ACCCTGTGCACCTTTG-T		76
FJ664610.1 Armillaria sinapina	TGTTGCTGACC-TGTTAA-AGGGTATGTGACCGT-CGAAAGT-TTACGCTTCTGTCGAAAGC-ACCCTGTGCACCTTTG-T		74
GU934598.1 Armillaria cepistip	TGTTGCTGACC-TGTTAA-AGGGTATGTGACCGT-CGAAAGT-TTACGCTTCTGTCGAAAGC-ACCCTGTGCACCTTTG-T		73
FJ734747.1 Armillaria himnulea	TGTTGCTGACC-TGTTAA-AGGGTATGTGACCGT-CGAAAGT-TTACGCTTCTGTCGAAAGC-ACCCTGTGCACCTTTG-T		74
FJ784175.1 Armillaria ostoyae	---GCTGAGAC-TGTTAAAGGGTATGTGACCGT-CGAAAGT-TTACGCTTCTGTCGAAAGC-ACCCTGTGCACCTTTG-T		71
FJ784171.1 Armillaria gallica	TGTTGCTGACC-TGTTAA-AGGGTATGTGACCGT-CGAAAGT-TTACGCTTCTGTCGAAAGC-ACCCTGTGCACCTTTG-T		77
FJ784168.1 Armillaria ectypa	TGTTGCTGACC-TGTTAA-AGGGTATGTGACCGT-CGAAAGT-TTACGCTTCTGTCGAAAGC-ACCCTGTGCACCTTTG-T		70
GQ1420201 Pleurotus pulmonarius	TGTTGCTGACC-TGTTAA-AGGGTATGTGACCGT-CGAAAGT-TTACGCTTCTGTCGAAAGC-ACCCTGTGCACCTTTG-T		65
FJ3748741 Ganoderma pseudoferr	CATTACCAAGCTTGGCT-GGGTGG-TAGCTGGCTTCCGAGGCATGTGCACG-CGCCC-CGATCCCATACACCTTTG-T		76
Laetiporus sulphureus	CATTACCAAGCTTGGCT-GGGTGG-TAGCTGGCTTCCGAGGCATGTGCACG-CGCCC-CGATCCCATACACCTTTG-T		46
Phellinus robinia	TGTTGCTGACC-TGTTAA-AGGGTATGTGACCGT-CGAAAGT-TTACGCTTCTGTCGAAAGC-ACCCTGTGCACCTTTG-T		78
ruler	1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80		
		Amtaxfor a	
Armillaria mellea	AGACTTGGTTAAGCTTCCCTTCCTTCAGCCGGTTAAAGGGTTCCTTCCTTCAGC- TAAGCTCCCTTTCCTTCAGC -AGTC		156
FJ875692.1 Armillaria mellea	AGACTTGGTTAAGCTTCCCTTCCTTCAGCCGGTTAAAGGGTTCCTTCCTTCAGC- TAAGCTCCCTTTCCTTCAGC -AGTC		156
FJ784173.1 Armillaria mellea	AGACTTGGTTAAGCTTCCCTTCCTTCAGCCGGTTAAAGGGTTCCTTCCTTCAGC- TAAGCTCCCTTTCCTTCAGC -AGTC		140
FJ784172.1 Armillaria mellea	AGACTTGGTTAAGCTTCCCTTCCTTCAGCCGGTTAAAGGGTTCCTTCCTTCAGC- TAAGCTCCCTTTCCTTCAGC -AGTC		155
FJ664610.1 Armillaria sinapina	AGACTTGGTTAAGCTTCCCTTCCTTCAGCCGGTTAAAGGGTTCCTTCCTTCAGC- TAAGCTCCCTTTCCTTCAGC -AGTC		143
GU934598.1 Armillaria cepistip	AGACTTGGTTAAGCTTCCCTTCCTTCAGCCGGTTAAAGGGTTCCTTCCTTCAGC- TAAGCTCCCTTTCCTTCAGC -AGTC		142
FJ734747.1 Armillaria himnulea	AGACTTGGTTAAGCTTCCCTTCCTTCAGCCGGTTAAAGGGTTCCTTCCTTCAGC- TAAGCTCCCTTTCCTTCAGC -AGTC		143
FJ784175.1 Armillaria ostoyae	AGACTTGGTTAAGCTTCCCTTCCTTCAGCCGGTTAAAGGGTTCCTTCCTTCAGC- TAAGCTCCCTTTCCTTCAGC -AGTC		140
FJ784171.1 Armillaria gallica	AGACTTGGTTAAGCTTCCCTTCCTTCAGCCGGTTAAAGGGTTCCTTCCTTCAGC- TAAGCTCCCTTTCCTTCAGC -AGTC		125
FJ784168.1 Armillaria ectypa	AGACTTGGTTAAGCTTCCCTTCCTTCAGCCGGTTAAAGGGTTCCTTCCTTCAGC- TAAGCTCCCTTTCCTTCAGC -AGTC		147
GQ1420201 Pleurotus pulmonarius	AGACTTGGTTAAGCTTCCCTTCCTTCAGCCGGTTAAAGGGTTCCTTCCTTCAGC- TAAGCTCCCTTTCCTTCAGC -AGTC		141
FJ3748741 Ganoderma pseudoferr	AGACTTGGTTAAGCTTCCCTTCCTTCAGCCGGTTAAAGGGTTCCTTCCTTCAGC- TAAGCTCCCTTTCCTTCAGC -AGTC		148
Laetiporus sulphureus	AGACTTGGTTAAGCTTCCCTTCCTTCAGCCGGTTAAAGGGTTCCTTCCTTCAGC- TAAGCTCCCTTTCCTTCAGC -AGTC		112
Phellinus robinia	AGACTTGGTTAAGCTTCCCTTCCTTCAGCCGGTTAAAGGGTTCCTTCCTTCAGC- TAAGCTCCCTTTCCTTCAGC -AGTC		148
ruler90.....100.....110.....120.....130.....140.....150.....160		
Armillaria mellea	TATGT-CTATATAAACTTT---TGATGTTT-AGAATGCTT-GTTTATAGGACG-CAAGTCCCTTAAA-TGTTATACAA		228
FJ875692.1 Armillaria mellea	TATGT-CTATATAAACTTT---TGATGTTT-AGAATGCTT-GTTTATAGGACG-CAAGTCCCTTAAA-TGTTATACAA		228
FJ784173.1 Armillaria mellea	TATGT-CTATATAAACTTT---TGATGTTT-AGAATGCTT-GTTTATAGGACG-CAAGTCCCTTAAA-TGTTATACAA		212
FJ784172.1 Armillaria mellea	TATGT-CTATATAAACTTT---TGATGTTT-AGAATGCTT-GTTTATAGGACG-CAAGTCCCTTAAA-TGTTATACAA		227
FJ664610.1 Armillaria sinapina	TATGT-CTATATAAACTTT---TGATGTTT-AGAATGCTT-GTTTATAGGACG-CAAGTCCCTTAAA-TGTTATACAA		215
GU934598.1 Armillaria cepistip	TATGT-CTATATAAACTTT---TGATGTTT-AGAATGCTT-GTTTATAGGACG-CAAGTCCCTTAAA-TGTTATACAA		214
FJ734747.1 Armillaria himnulea	TATGT-CTATATAAACTTT---TGATGTTT-AGAATGCTT-GTTTATAGGACG-CAAGTCCCTTAAA-TGTTATACAA		215
FJ784175.1 Armillaria ostoyae	TATGT-CTATATAAACTTT---TGATGTTT-AGAATGCTT-GTTTATAGGACG-CAAGTCCCTTAAA-TGTTATACAA		212
FJ784171.1 Armillaria gallica	TATGT-CTATATAAACTTT---TGATGTTT-AGAATGCTT-GTTTATAGGACG-CAAGTCCCTTAAA-TGTTATACAA		197
FJ784168.1 Armillaria ectypa	TATGT-CTATATAAACTTT---TGATGTTT-AGAATGCTT-GTTTATAGGACG-CAAGTCCCTTAAA-TGTTATACAA		222
GQ1420201 Pleurotus pulmonarius	TATGT-CTATATAAACTTT---TGATGTTT-AGAATGCTT-GTTTATAGGACG-CAAGTCCCTTAAA-TGTTATACAA		217
FJ3748741 Ganoderma pseudoferr	TATGT-CTATATAAACTTT---TGATGTTT-AGAATGCTT-GTTTATAGGACG-CAAGTCCCTTAAA-TGTTATACAA		207
Laetiporus sulphureus	TATGT-CTATATAAACTTT---TGATGTTT-AGAATGCTT-GTTTATAGGACG-CAAGTCCCTTAAA-TGTTATACAA		173
Phellinus robinia	TATGT-CTATATAAACTTT---TGATGTTT-AGAATGCTT-GTTTATAGGACG-CAAGTCCCTTAAA-TGTTATACAA		210
ruler170.....180.....190.....200.....210.....220.....230.....240		
Armillaria mellea	CTTTCAACACGGATCTCTTGGCTCTCCGATCGATGAAGAACCAAGAAATGCGATAAATTAATGAAATTCAGAAATTC		308
FJ875692.1 Armillaria mellea	CTTTCAACACGGATCTCTTGGCTCTCCGATCGATGAAGAACCAAGAAATGCGATAAATTAATGAAATTCAGAAATTC		308
FJ784173.1 Armillaria mellea	CTTTCAACACGGATCTCTTGGCTCTCCGATCGATGAAGAACCAAGAAATGCGATAAATTAATGAAATTCAGAAATTC		292
FJ784172.1 Armillaria mellea	CTTTCAACACGGATCTCTTGGCTCTCCGATCGATGAAGAACCAAGAAATGCGATAAATTAATGAAATTCAGAAATTC		307
FJ664610.1 Armillaria sinapina	CTTTCAACACGGATCTCTTGGCTCTCCGATCGATGAAGAACCAAGAAATGCGATAAATTAATGAAATTCAGAAATTC		295
GU934598.1 Armillaria cepistip	CTTTCAACACGGATCTCTTGGCTCTCCGATCGATGAAGAACCAAGAAATGCGATAAATTAATGAAATTCAGAAATTC		294
FJ734747.1 Armillaria himnulea	CTTTCAACACGGATCTCTTGGCTCTCCGATCGATGAAGAACCAAGAAATGCGATAAATTAATGAAATTCAGAAATTC		295
FJ784175.1 Armillaria ostoyae	CTTTCAACACGGATCTCTTGGCTCTCCGATCGATGAAGAACCAAGAAATGCGATAAATTAATGAAATTCAGAAATTC		292
FJ784171.1 Armillaria gallica	CTTTCAACACGGATCTCTTGGCTCTCCGATCGATGAAGAACCAAGAAATGCGATAAATTAATGAAATTCAGAAATTC		277
FJ784168.1 Armillaria ectypa	CTTTCAACACGGATCTCTTGGCTCTCCGATCGATGAAGAACCAAGAAATGCGATAAATTAATGAAATTCAGAAATTC		302
GQ1420201 Pleurotus pulmonarius	CTTTCAACACGGATCTCTTGGCTCTCCGATCGATGAAGAACCAAGAAATGCGATAAATTAATGAAATTCAGAAATTC		297
FJ3748741 Ganoderma pseudoferr	CTTTCAACACGGATCTCTTGGCTCTCCGATCGATGAAGAACCAAGAAATGCGATAAATTAATGAAATTCAGAAATTC		287
Laetiporus sulphureus	CTTTCAACACGGATCTCTTGGCTCTCCGATCGATGAAGAACCAAGAAATGCGATAAATTAATGAAATTCAGAAATTC		253
Phellinus robinia	CTTTCAACACGGATCTCTTGGCTCTCCGATCGATGAAGAACCAAGAAATGCGATAAATTAATGAAATTCAGAAATTC		290
ruler250.....260.....270.....280.....290.....300.....310.....320		
Armillaria mellea	AGTGAATCATCGAATCTTTGAACACACCTTGCCTTGGTATTCGAGAGGGCATGCGCTTTTGAATTCAGAAATTC		388
FJ875692.1 Armillaria mellea	AGTGAATCATCGAATCTTTGAACACACCTTGCCTTGGTATTCGAGAGGGCATGCGCTTTTGAATTCAGAAATTC		388
FJ784173.1 Armillaria mellea	AGTGAATCATCGAATCTTTGAACACACCTTGCCTTGGTATTCGAGAGGGCATGCGCTTTTGAATTCAGAAATTC		372
FJ784172.1 Armillaria mellea	AGTGAATCATCGAATCTTTGAACACACCTTGCCTTGGTATTCGAGAGGGCATGCGCTTTTGAATTCAGAAATTC		387
FJ664610.1 Armillaria sinapina	AGTGAATCATCGAATCTTTGAACACACCTTGCCTTGGTATTCGAGAGGGCATGCGCTTTTGAATTCAGAAATTC		375
GU934598.1 Armillaria cepistip	AGTGAATCATCGAATCTTTGAACACACCTTGCCTTGGTATTCGAGAGGGCATGCGCTTTTGAATTCAGAAATTC		374
FJ734747.1 Armillaria himnulea	AGTGAATCATCGAATCTTTGAACACACCTTGCCTTGGTATTCGAGAGGGCATGCGCTTTTGAATTCAGAAATTC		375
FJ784175.1 Armillaria ostoyae	AGTGAATCATCGAATCTTTGAACACACCTTGCCTTGGTATTCGAGAGGGCATGCGCTTTTGAATTCAGAAATTC		377
FJ784171.1 Armillaria gallica	AGTGAATCATCGAATCTTTGAACACACCTTGCCTTGGTATTCGAGAGGGCATGCGCTTTTGAATTCAGAAATTC		382
FJ784168.1 Armillaria ectypa	AGTGAATCATCGAATCTTTGAACACACCTTGCCTTGGTATTCGAGAGGGCATGCGCTTTTGAATTCAGAAATTC		382
GQ1420201 Pleurotus pulmonarius	AGTGAATCATCGAATCTTTGAACACACCTTGCCTTGGTATTCGAGAGGGCATGCGCTTTTGAATTCAGAAATTC		377
FJ3748741 Ganoderma pseudoferr	AGTGAATCATCGAATCTTTGAACACACCTTGCCTTGGTATTCGAGAGGGCATGCGCTTTTGAATTCAGAAATTC		367
Laetiporus sulphureus	AGTGAATCATCGAATCTTTGAACACACCTTGCCTTGGTATTCGAGAGGGCATGCGCTTTTGAATTCAGAAATTC		333
Phellinus robinia	AGTGAATCATCGAATCTTTGAACACACCTTGCCTTGGTATTCGAGAGGGCATGCGCTTTTGAATTCAGAAATTC		370
ruler330.....340.....350.....360.....370.....380.....390.....400		

CLUSTAL X (1.81) MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT

	**** *	**	* ****	* * * **	* ** *****	
Armillaria mellea	C	T	C	A	A	C
FJ875692.1 Armillaria mellea	F	J	8	7	5	6
EU784173.1 Armillaria mellea	E	U	7	8	4	1
EU784172.1 Armillaria mellea	E	U	7	8	4	1
FJ664610.1 Armillaria sinapina	F	J	6	6	4	6
GU934598.1 Armillaria cepistip	G	U	9	3	4	5
EU734747.1 Armillaria hinnulea	E	U	7	3	4	7
EU784175.1 Armillaria ostoyae	E	U	7	8	4	1
EU784171.1 Armillaria gallica	E	U	7	8	4	1
EU784168.1 Armillaria ectypa	E	U	7	8	4	1
GQ1420201 Pleurotus pulmonariu	G	Q	1	4	2	0
FJ3748741 Ganoderma pseudoferr	F	J	3	7	4	8
Laetiporus sulphureus	L	a	e	t	i	p
Phellinus robinia	P	h	e	l	l	i
ruler	410	420	430
	440	450	460
	470	480	490
	500	510	520
	530	540	550
	560	570	580
	590	600	610
	620	630	640
	650	660	670
	680	690	700
	710	720	730
	740	750	760
	770	780	790
	800	810	820
	830	840	850
	860	870	880
	890	900	910
	920	930	940
	950	960	970
	980	990	1000

Abbildung 13: Darstellung des ITS-Bereiches der Sequenzen von *Armillaria mellea*, verschiedener *Armillaria*-Arten und Basidiomyceten mittels Clustal X (1.81).

Insgesamt wurden vier *Armillaria mellea* Stämme und ihre Sequenzen für die Untersuchungen herangezogen, welche in Abbildung 13 mit der zu erkennenden Referenznummer in der Datenbank von NCBI zu finden sind. Sequenzen die keine Nummer enthalten wurden im Labor Magel erarbeitet.

Um die spezifische Bindung der Primer an die *A. mellea* Sequenz zu festigen und zur Überprüfung der unter 2.3.9 genannten Bedingungen, wurden verschiedene *Armillaria*-Arten zur Taxon-Primer Erstellung hinzugezogen:

- *Armillaria sinapina*
- *Armillaria cepistipes*
- *Armillaria hinnulea*
- *Armillaria ostoyae*
- *Armillaria gallica*
- *Armillaria ectypa*

Ebenfalls wurden über die Gattungsgrenze hinaus vier Basidiomyceten, holzerstörenden Pilzen, zur umfangreicheren Kontrolle und Absicherung der Taxon-Primer Spezifität, herangezogen:

- *Pleurotus pulmonarius*
- *Ganoderma pseudoferreum*
- *Laetiporus sulphureus*
- *Phellinus robiniae*

Die genauere Prüfung der vorläufigen Primer bezog sich auf die Berechnung und Anpassung der jeweiligen Schmelztemperaturen. Hierfür wurde das Tool der Firma Eurofins MWG Operon (www.mwg-biotech.com) verwendet.

Die für den Hybridisierungsprozess der PCR gewählte Temperatur betrug 55°C. Damit keine Fehler während dieser Annealing-Phase auftreten, muss die Schmelztemperatur der Primer an die Annealing-Temperatur angeglichen werden. Durch das Weglassen oder Hinzufügen einzelner endständiger Basen wurden die Schmelztemperaturen optimiert, sodass sie im Mittel bei 55°C lagen und ihre Differenz zueinander nicht mehr als 3,5°C betrug.

Die sich im ITS2-Bereich befindenden Primer (Amtaxrev a, Amtaxrev b, Amtaxrev 1) sollten als reverse-Primer genutzt werden. Daher wurden aus ihnen entsprechende reverse komplementäre Basenabfolgen erstellt.

Tabelle 12 zeigt die mit Hilfe der Tools Mega5, Blast und MWG erarbeiteten Resultate. Es wurden drei for-Primer (Amtaxfor a, Amtaxfor b, Amtaxfor 1) erarbeitet, die sich im ITS1 Bereich befinden und drei rev-Primer (Amtaxrev a, Amtaxrev b, Amtaxrev 1), die im ITS2 Bereich liegen.

Tabelle 12: Erstellte Taxon-Primer für *Armillaria mellea* unterteilt in Bereich, Name, Sequenz, Primer und Schmelztemperatur

Bereich	Name	Sequenz	Primer	Schmelztemp.
ITS1	Amtax-for a	CTAAGCTCCG TTTGTCTTAC	CTAAGCTCCGTTTGTCTTAC	55,3°C
ITS1	Amtax-for b	GTTACKGGTTC TGTTCTAATC	GTTACKGGTTCTGTTCTAATC	54,9°C
ITS1	Amtax-for 1	CAAAGTGTTACK GGTTCTGTTCTA	CAAAGTGTTACKGGTTCTGTTCTA	58,4°C
ITS2	Amtax-rev a	GCCAGTTTCC TTACCACTC	GAGTGGTAAGGAAACTGGC	56,7°C
ITS2	Amtax-rev b	CSGTAACAAG AAACTCTTGG	CCAAGAGTTTCTTGTTACSG	55,3°C
ITS2	Amtax-rev 1	TTCCTTACCACTC TAACTCTTTAT	ATAAAGAGTTAGAGTGGTAAGGAA	55,9°C

Die Buchstaben S und K in den Basenabfolgen sind sogenannte Wobble. Aminosäuren können durch den degenerierenden Code mittels verschiedener Codon-Triplets codiert werden. Der Unterschied einer Base im Triplet, im Vergleich verschiedener Stamm-Sequenzen, kann durch ein Wobble ausgedrückt werden. K steht für die Basen G+T und S für G+C.

Der Primer Amtaxrev b wurde mit einem Wobble versehen, da sich an der Basenposition 740 (Abbildung 13) in den vier zusammengetragenen *A. mellea* Sequenzen, nicht eindeutig die Base Cytosin oder Guanin befindet. Da sich in der Basenposition 740 keine Basen der mitgeführten *Armillaria* und Basidiomyceten Sequenzen befinden, ist der Einsatz eines Wobbels gerechtfertigt, ohne starken Einfluss auf die Primerspezifität zu nehmen.

Die ausgesuchten forward- und reverse-Primer wurden miteinander kombiniert, um zu ermitteln, welches der Primerpaare die beste spezifische Bindung an die Sequenz von *Armillaria mellea* zeigt. In Tabelle 13 sind die verschiedenen Primerpaare aufgelistet. Der mit den Primer zu amplifizierende Bereich hat die Länge von 435 bis 658 Basenpaaren. Dadurch variieren die durchschnittlichen Schmelztemperaturen von 55,3°C bis 57,6°C.

Tabelle 13: Auflistung der Taxon-Primerpaare mit jeweiliger Länge [bp] und Durchschnittsschmelztemperatur

Primerpaar	Länge [bp]	Ø Schmelztemperatur
Amtaxfor 1 + Amtaxrev 1	ca. 532	57,2°C
Amtaxfor 1 + Amtaxrev a	ca. 536	57,6°C
Amtaxfor 1 + Amtaxrev b	ca. 664	55,6°C
Amtaxfor a + Amtaxrev 1	ca. 435	55,6°C
Amtaxfor a + Amtaxrev a	ca. 442	56°C
Amtaxfor a + Amtaxrev b	ca. 556	55,3°C
Amtaxfor b + Amtaxrev 1	ca. 526	55,4°C
Amtaxfor b + Amtaxrev a	ca. 532	55,8°C
Amtaxfor b + Amtaxrev b	ca. 658	55,1C

3.3.1 Überprüfung der erstellten Taxon-Primer

Die erstellten Taxon-Primer mussten auf ihre Qualität und Spezifität in Bezug auf *Armillaria mellea* überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden PCRs, mit den verschiedenen Kombinationen der Primer als Primerpaare, durchgeführt. Als Template diente das erste und zweite Eluat der DNA-Extraktion aus der Reinkultur von *Armillaria mellea*. Da die Primer unterschiedliche Längen aufweisen, variiert die Elongationszeit während der PCR. Die Faustregel besagt, dass in etwa 60 Sekunden 1000 bp amplifiziert werden. In Tabelle 14 wurden folgende Elongationszeiten für die Primerpaare bestimmt.

Tabelle 14: Verwendete Primerpaare mit entsprechender Elongationszeit für die PCR

Primerpaar	Länge [bp]	Elongationszeit
Amtaxfor 1 + Amtaxrev 1	ca. 532	35 sek.
Amtaxfor 1 + Amtaxrev a	ca. 536	
Amtaxfor a + Amtaxrev 1	ca. 435	
Amtaxfor a + Amtaxrev a	ca. 442	
Amtaxfor a + Amtaxrev b	ca. 556	
Amtaxfor b + Amtaxrev 1	ca. 526	
Amtaxfor b + Amtaxrev a	ca. 532	
Amtaxfor b + Amtaxrev b	ca. 658	40 sek.
Amtaxfor 1 + Amtaxrev b	ca. 664	

Die Annealing-Temperatur von 55°C wurde aus dem PCR Standard-Programm für die häufig genutzten Primer ITS1.1/ITS4 übernommen (Tabelle 7). Dieser Temperatur wurden die Schmelzpunkte der Primer-Kombinationen durchschnittlich angeglichen.

Abbildung 14 zeigt das Ergebnis der Agarose-Gelelektrophorese dieser PCR. Das Gelbild veranschaulicht, dass mit allen Kombinationen eine Amplifikation möglich war. Jede

numerische Kennzeichnung umfasst drei Geltaschen In Leserichtung ergibt sich folgende Einteilung: Erstes Eluat der Extraktion, zweites Eluat der Extraktion und Negativkontrolle. Die Länge der erhaltenen Amplifikate entspricht den aus den Sequenzen berechneten Längen in Tabelle 13.

Abgesehen von dem Primerpaar Amtaxfor a/Amtaxrev a (Abb. 14 Nummer 5) und Amtaxfor a/Amtaxrev b (Abb. 14 Nummer 6) ist auf dem Gel bei allen Primer-Kombinationen eine Banden zu erkennen. D.h. die Primerpaare binden spezifisch an die *Armillaria mellea* Sequenz aus dem ersten sowie zweiten Eluat der Pilzextraktion, da in beiden Eluaten genügend DNA von *A. mellea* extrahiert wurde.

Die Negativkontrollen haben ebenfalls funktioniert, da keine Banden an den jeweiligen Stellen zu erkennen sind. In der Negativkontrolle befindet sich nur der Mastermix Ansatz. Das Fehlen einer Bande in dieser Geltasche ist der Nachweis dafür, dass der Mastermix-Ansatz korrekt zusammengesetzt wurde und nicht kontaminiert ist.

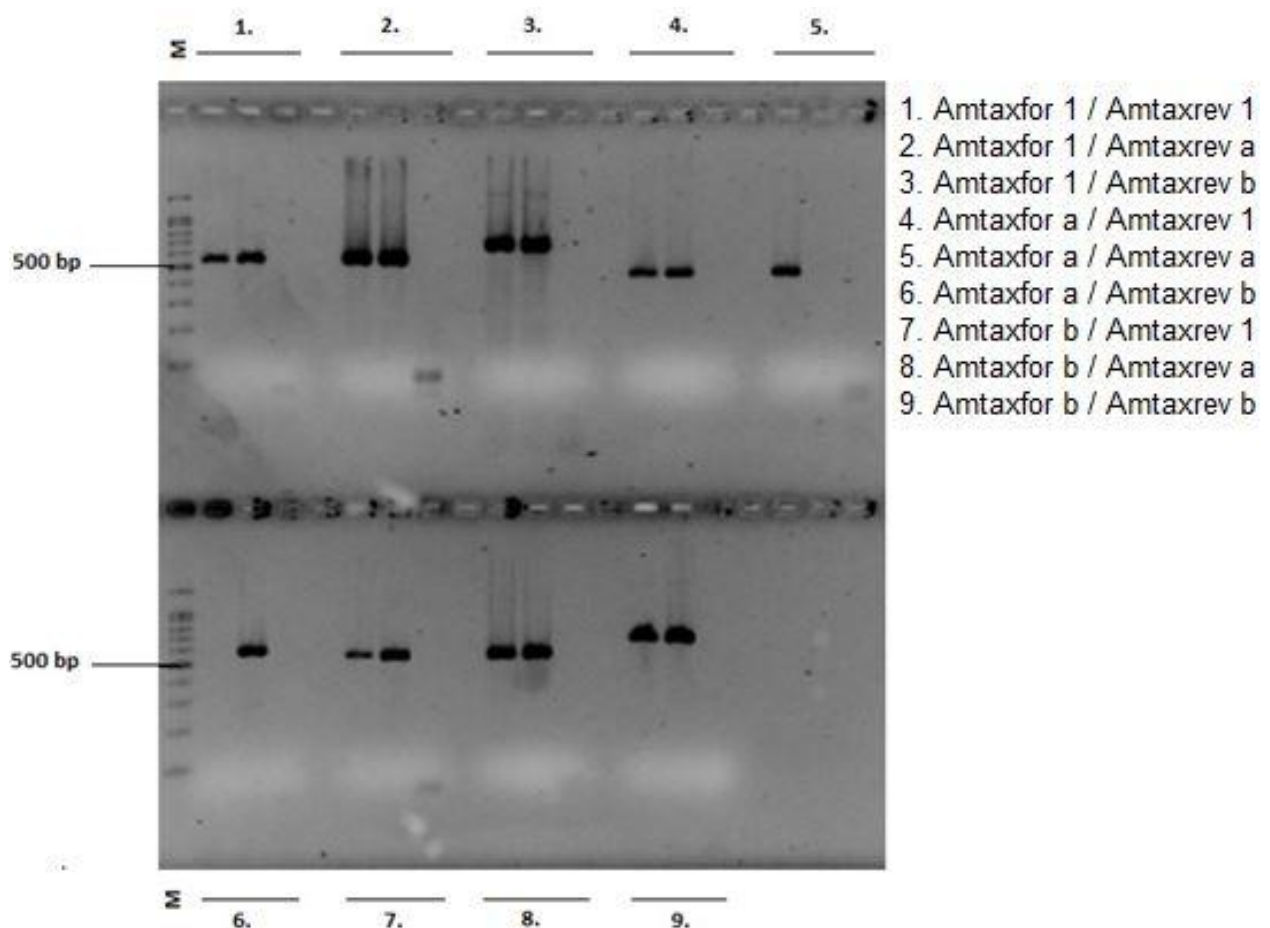


Abbildung 14: Darstellung der PCR-Produkte der Primerpaare auf einem 2,5%igen Gel. Als Template diente die *Armillaria mellea* Reinkultur. 1. Amtaxfor 1/Amtaxrev 1, 2. Amtaxfor 1/Amtaxrev a, 3. Amtaxfor 1/Amtaxrev b, 4. Amtaxfor a/Amtaxrev 1, 5. Amtaxfor a/Amtaxrev a, 6. Amtaxfor a/Amtaxrev b, 7. Amtaxfor b/Amtaxrev 1, 8. Amtaxfor b/Amtaxrev a, 9. Amtaxfor b/Amtaxrev b. Alle Primerpaare zeigen eine Amplifikation. Die Negativkontrollen zeigen keine Amplifikation auf. Zum Längenabgleich dient ein 100 bp Marker.

Um die Spezifität der Taxon-Primer abzusichern, wurden die mit den verwendeten Primer-Kombinationen erhaltene Amplifikate sequenziert. Dadurch lässt sich ein Rückschluss auf die Spezifität ziehen (Kapitel 2.3.8). Exemplarisch sind in Abbildung 15 und 16 die Sequenzierungsergebnisse mit den Primerpaaren Amtaxfor 1/Amtaxrev a und Amtaxfor b/Amtaxrev b dargestellt.

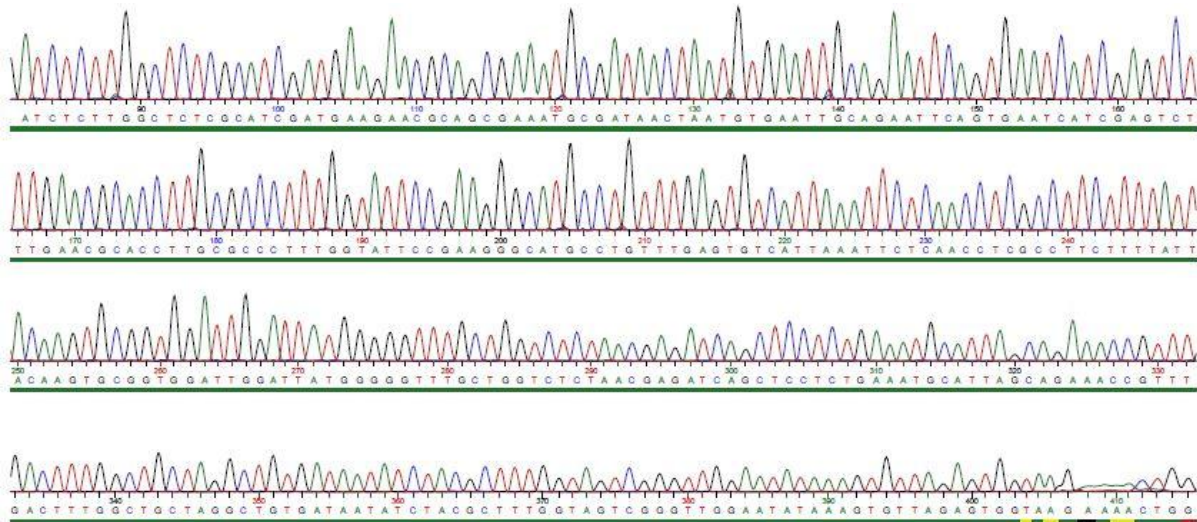


Abbildung 15: Ausschnitt aus dem Programm der Sequenzierung der Primer Amtaxfor 1/Amtaxrev a. Der Ausschnitt entspricht den Positionen 82 bis 415 im Alignment.

In beiden Abbildungen ist ein Ausschnitt der Ergebnisse in Form eines Chromatogramms zu sehen, welches saubere Basenabfolgen mit kaum vorhandenen Überlappungen zeigt, wodurch die Qualität der Primer-Kombinationen als gut befunden wurde.

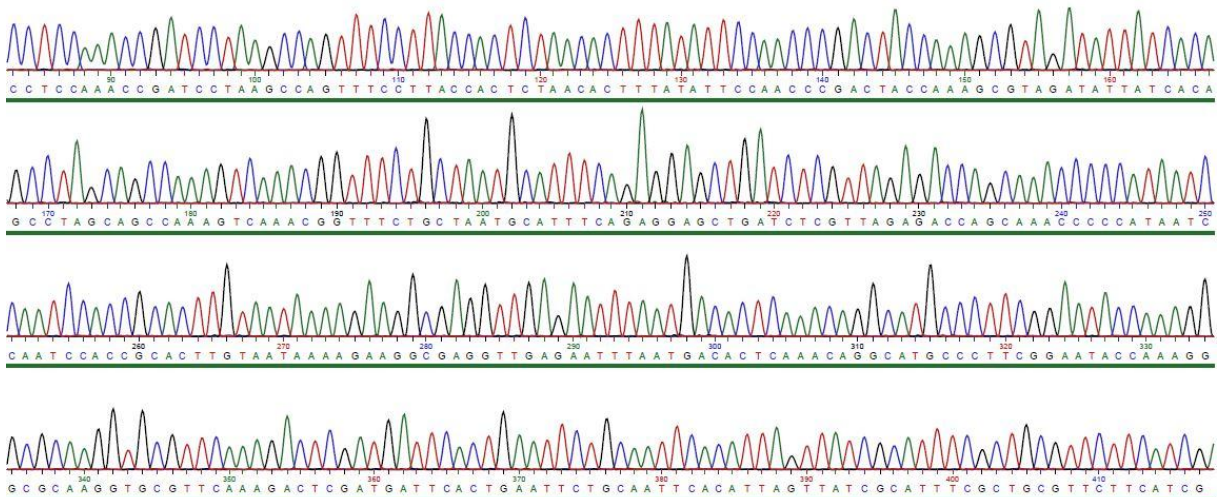


Abbildung 16: Ausschnitt aus dem Programm der Sequenzierung der Primer Amtaxfor b/Amtaxrev b. Der Ausschnitt entspricht den Positionen 83 bis 416 im Alignment.

Obwohl alle Primer-Kombinationen eine Amplifikation mit *A. mellea* aufwiesen, musste eine Entscheidung getroffen werden. Diese erfolgte mittels Ausschlussverfahren: Primerpaare, bei denen es nur in einem Eluat zur Amplifikation gekommen war, wurden ausgeschlossen (Amtaxfor a/Amtaxrev a und Amtaxfor a/Amtaxrev b), sowie die Kombinationen die etwas schwächere Banden im Gelbild zeigten (Amtaxfor a/Amtaxrev 1 und Amtaxfor b/Amtaxrev 1). Auf Grund der Länge von etwa 540 bp und der Bandenintensität im Gelbild Abbildung 14 sowie den sauberen Basenabfolgen die aus der Sequenzierung hervorgingen (Abbildung 15 und 16) wurde entschieden mit dem Amtaxfor 1/ Amtaxrev a Primer weiter zu arbeiten.

3.4 Nachweis von *Armillaria mellea* in *Robinia pseudoacacia* Proben

3.4.1 Nachweis von *A. mellea* mit dem Taxon-Primer Amtaxfor 1/Amtaxrev a im Vorversuch

Nachdem die erstellten Taxon-Primer-Kombinationen auf ihre Spezifität getestet worden sind und entschieden wurde Amtaxfor 1/Amtaxrev a für die Untersuchungen der Robinien einzusetzen, konnten mit Hilfe der PCR und der anschließenden Dokumentation durch die Agarose-Gelelektrophorese die DNA-Extrakte – mittels der Taxon-Primer – auf einen eventuellen Befall des Pilzes *Armillaria mellea* überprüft werden. Der PCR-Ansatz hierfür kann aus der Tabelle 6 entnommen werden.

Das Ergebnis dieser PCR waren „leere“ Gelbilder. D.h. in diesen Proben kam es unter dem Einsatz der Primer-Kombination Amtaxfor 1/Amtaxrev a zu keiner Amplifikation. Nur in der Positivkontrolle, in der sich das Template der Reinkultur von *A.mellea* befand, kam es zur Amplifikation.

Um eventuelle Inhibitoren zu eliminieren wurden Verdünnungsreihen (1:10 – 1:200) angesetzt und das Template (0,5 µl – 2 µl) variiert. Durch den Austausch aller verwendeten Reagenzien sollten mögliche Verunreinigungen in den Substanzen beseitigt werden. Trotz vorgenommener Maßnahmen, waren auf dem Gelbild keine Banden nachzuweisen. Exemplarisch dazu dient Abbildung 17 mit der Robinienprobe #8 ws Juli. Es wurde die Annahme aufgestellt, dass in diesen Proben keine *Armillaria mellea* nachzuweisen war.

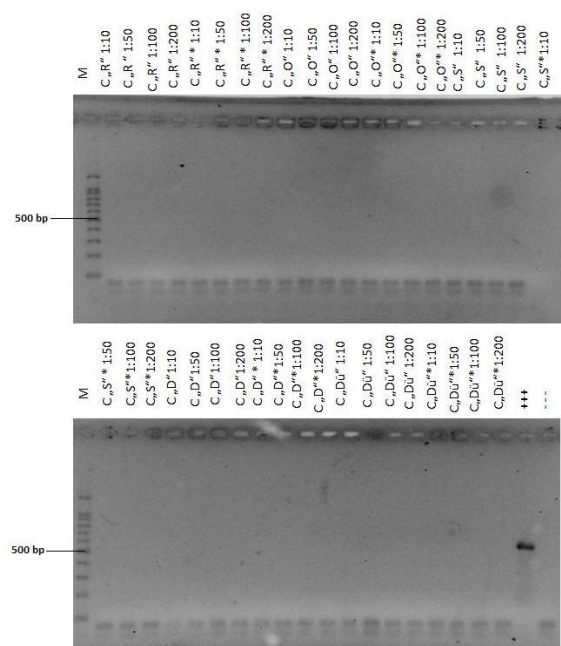


Abbildung 17: Darstellung der PCR-Produkte der Robinienprobe #8 ws Juli mit Amtaxfor 1/Amtaxrev a. In = Inoculated, C = Control, R = Reaction-Zone; D = Decay-Zone, O = Callus, Dü = Dübel, S = Sound-Zone, +++ = *A. mellea* Reinkultur, --- = Negativkontrolle/Mastermixansatz. Alle getesteten Proben, bis auf die Positivkontrolle, zeigen keine Amplifikation. Zum Längenabgleich dient ein 100 bp Marker.

Um Sicherheit für diese Annahme zu gewinnen, dass sich in den untersuchten Robinienproben tatsächlich keine *A. mellea* befindet, wurden die Proben auf intakte DNA überprüft. Es sollte ausgeschlossen werden, dass die fehlende Amplifikation mittels der Primierkombination Amtaxfor 1/Amtaxrev a, aufgrund von nicht intakter DNA zu Stande gekommen ist. Dazu wurden die Primer ITS1.1 und ITS4 verwendet. Diese amplifizieren in Kombination den gesamten ITS Bereich.

Die Ergebnisse der Überprüfung der DNA zeigten, dass mit allen Proben der Robinien eine Amplifikation möglich war. Exemplarisch sind diese in Abbildung 18 an der Robinie #8 ws Juli zu erkennen.

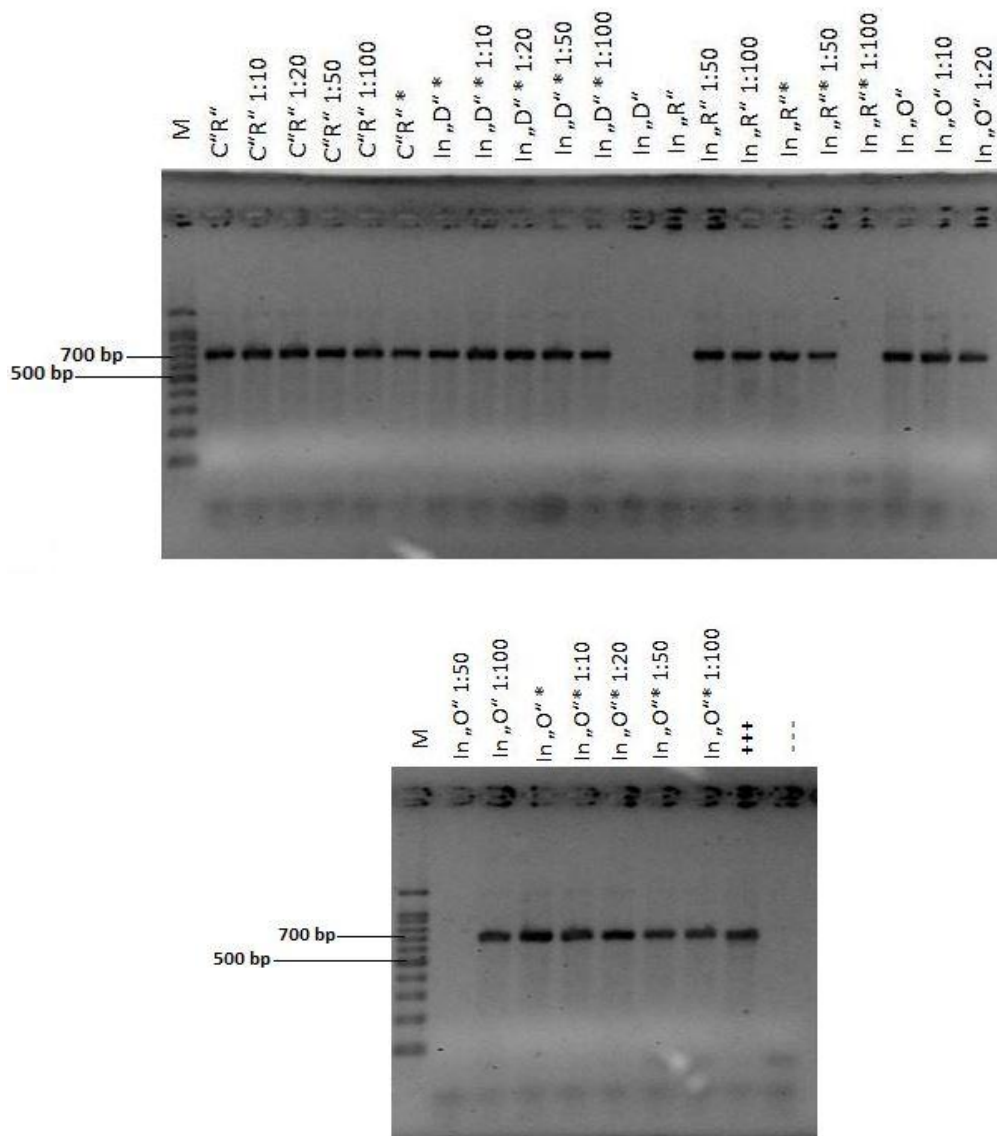


Abbildung 18: Darstellung der PCR-Produkte der Robinie #8 ws Juli mit den Primer ITS1.1/ITS4. In = Inoculated, C = Control, R = Reaction zone; D = Decay zone, O = Callus, +++ = *A. mellea* Reinkultur, --- = *Negativkontrolle/Mastermixansatz*. Alle Proben konnten erfolgreich amplifiziert werden. Die Negativkontrollen zeigen keine Amplifikation. Zum Längenabgleich dient ein 100 bp Marker.

Anhand der Robinie #8 ws Juli erkennt man auf der Darstellung des Gelbildes in Abbildung 18, dass mit Hilfe von Verdünnungen die von 1:10 bis 1:100 durchgeführt worden sind, jede Probe eine Bande aufweist. Dies bedeutet, dass die Primer-Kombination ITS1.1/ITS4 erfolgreich an die DNA gebunden hatte und die DNA in den Proben intakt war.

Die Höhe der Banden stimmt mit der bp Länge von *Robinia pseudoacacia* überein – etwa 750 bp. Es sind keine Doppelbanden zu erkennen. Die Primer ITS1.1 und ITS4 amplifizieren den gesamten ITS Bereich, d.h. Holz-DNA und Pilz-DNA. Neben der Gelbande von *R. pseudoacacia* bei etwa 750 bp sind keine zusätzlichen Banden auf der Höhe von etwa 850 bp zu erkennen, welches der Länge von *Armillaria mellea* Sequenzen entspricht. Dieses Ergebnis bekräftigt die Annahme, dass sich in den getesteten Robinienproben tatsächlich keine *A. mellea* befindet bzw. ein Nachweis nicht möglich war.

Es wäre möglich, dass Baum #8 ws Juli die Pilzinfektion effektiv abgeschottet hat und daher keine Banden zu sehen sind. Ebenso könnte die geringe Menge an *Armillaria mellea* in den Proben bzw. in den jeweiligen Zonen im Baum ein Grund dafür sein, dass keine Banden bei genannter Pilzlänge zu sehen sind, da der Pilzgehalt unter der Nachweisgrenze liegt.

Um die Sequenz der Pilz-DNA etwas genauer zu untersuchen, statt mit den gesamten ITS Bereich amplifizierenden Primer ITS1.1 und ITS4, wurden PCR-Untersuchungen mit Pilz-Primer durchgeführt, die Pilz-DNA spezifischer detektieren bzw. amplifizieren. Diese Tests, unter Einsatz der Primer-Kombinationen ITS1.1/Pilzrev 1 und Pilzfor 1/ITS4, sollten die Annahme festigen, dass sich in den Proben keine *A. mellea* befindet.

In der Robinienprobe #8 ws Juli konnten unter diesen Bedingungen keine Amplifikationen ermittelt werden. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass in der *R. pseudoacacia* Probe #8 ws Juli keine Pilz-DNA nachgewiesen werden konnte und somit auch nicht die Pilz-DNA von *A. mellea*.

Die anderen Baumproben zeigen unter der Verwendung der pilzspezifischen Primer Pilzfor 1/ITS4 Amplifikationen. Exemplarisch dafür ist das Ergebnis der PCR, der Robinie #3 ws Februar mit dem Primerpaar Pilzfor 1/ITS4, in Abbildung 19 zu sehen.

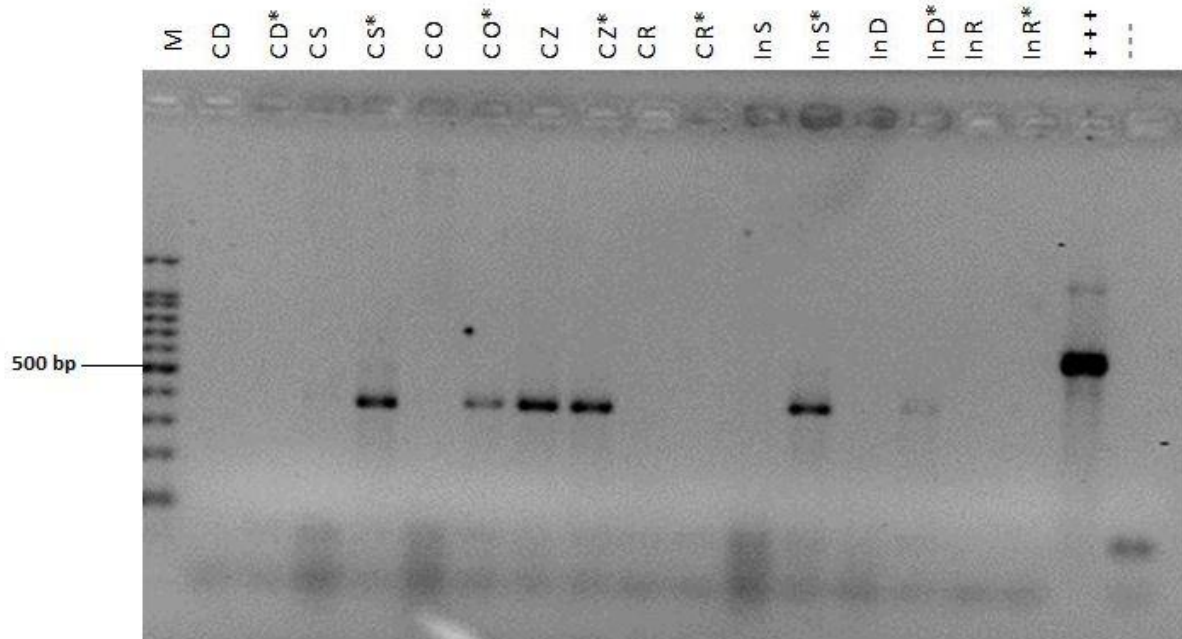


Abbildung 19: Darstellung der PCR-Produkte der Baumprobe #3 ws Feb. mit der Primer-Kombination Pilzfor 1/ITS4. In = Inoculated, C = Control, R = Reaction-Zone; D = Decay-Zone, O = Callus, Dü = Dübel, S = Sound-Zone, Z = Scattered-Zone, +++ = *A. mellea* Reinkultur, --- = Negativkontrolle/Mastermixansatz. Die Proben CS*, CO*, CZ, CZ* und InS* zeigen jeweils eine Bande in Höhe von 400 bp. Die Negativkontrollen zeigen keine Amplifikation. Zum Längenabgleich dient ein 100 bp Marker.

Das Gelbild bzw. die PCR kann aufgrund der Ergebnisse der Positiv- sowie Negativkontrolle als erfolgreich angesehen werden. Mit dem verwendeten Primer Pilzfor 1/ ITS4 hat die *Armillaria mellea* Sequenz eine Länge von etwa 596 bp. Diese stimmt mit der Länge der Bande der Positivkontrolle auf dem Gelbild in Abbildung 19 überein.

Eine schwache und starke Bandenintensität ist bei den Proben CS*, CO*, CZ, CZ*, In S* und InD* festzustellen. Da sich alle Banden auf der Höhe von etwa 400 bp befinden, wird die Vermutung bekräftigt, dass zwar Pilz-DNA in den Robinienproben vorliegt, es sich hierbei jedoch nicht um den Pilz *Armillaria mellea* handelt. Dessen Bande liegt bei etwa 596 bp.

An den gezeigten Robinienbeispiel #8 ws Juli und #3 ws Februar konnte dank dieses Versuches unter Einsatz der Primer-Kombination Pilzfor 1/ITS4 erneut nachgewiesen werden, dass *A.mellea* nicht amplifiziert wurde und somit nicht in den Proben nachweisbar war.

Zur Absicherung, dass es sich bei den aufgetretenen Banden (Abbildung 19) tatsächlich nicht um *A.mellea*. handelt, wurden die PCR-Produkte der Proben CZ und InS* der Robinie #3 ws Feb. aufgereinigt und sequenziert (Kapitel 3.4.1.1).

3.4.1.1 Überprüfung und Identifizierung des unbekanntes Pilzes mittels Sequenzierung

In den Robinenproben konnte, mit Hilfe der Primer-Kombination Pilzfor 1/ITS4, Pilz-DNA nachgewiesen werden. Die DNA aus diesen PCR Produkten konnte jedoch aufgrund der Basenpaarlänge nicht *A. mellea* zugewiesen werden. Um diese Pilz-DNA eindeutig zuordnen zu können, wurden Sequenzierungen durchgeführt.

Die Proben CZ und InS* der Robinie #3 ws Feb wurden zur Bestimmung ihrer Basensequenz sequenziert.

Die Sequenzierung der exemplarisch ausgewählten #3 ws Feb. Proben – mittels pilzspezifischer Primer (Pilzfor 1/ITS4) – sollte die bisherigen Ergebnisse in der Annahme stützen, dass kein *Armillaria mellea* Vorkommen nachzuweisen war und Aufschluss darüber geben, um welchen Pilz es sich handelte, der unter 3.4.1 in Abbildung 19 detektiert wurde.

Die Resultate der Sequenzierung wurden mit der Datenbank der NCBI verglichen, was in Abbildung 20 zu erkennen ist. In dieser sieht man den Abgleich der sequenzierten Probe #3 ws Feb. mit der NCBI Datenbank. Entscheidend ist der Identitätswert der hier bei 99% liegt, bei einem query coverage-Wert von 97%. Dieser Deckungswert gibt an, inwieweit die gesuchte Sequenz mit der ermittelten Sequenz übereinstimmt.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
584 bits(316)	2e-163	321/323(99%)	1/323(0%)	Plus/Plus
Query 3	AATGCGATAAGTAATGTGAATGCCGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT	62		
Sbjct 280	AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT	339		
Query 63	TGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCT	122		
Sbjct 340	TGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCT	399		
Query 123	GGCTTGGTGTGGGGCACTGCCTCCTCGCGGGGGCAGGCCCTGAAATACAGTGGCGAGCT	182		
Sbjct 400	GGCTTGGTGTGGGGCACTGCCTCCTCGCGGGGGCAGGCCCTGAAATACAGTGGCGAGCT	459		
Query 183	CGCCAGGACTCCGAGCGCAGTAGTTAAACCCCTCGCTCTGGAAGGCCTGGCGGTGCCCTGC	242		
Sbjct 460	CGCCAGGACTCCGAGCGCAGTAGTTAAACCCCTCGTCTGGAAGGCCTGGCGGTGCCCTGC	519		
Query 243	CGTTAAA-CCCCAACTCCTGAAAATTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACT	301		
Sbjct 520	CGTTAAACCCCAACTCCTGAAAATTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACT	579		
Query 302	TAAGCATATCAATAAGCGGAGGA	324		
Sbjct 580	TAAGCATATCAATAAGCGGAGGA	602		

Abbildung 20: Abgleich der sequenzierten #3 ws Feb. Proben, mittels pilzspezifischer Primer Pilzfor 1/ITS4, mit der NCBI-Datenbank mittel BLAST. Identitätswert beträgt 99% bei einem query coverage von 97% für *Diaporthe phaseolorum*.

Mit Hilfe dieser Gegenüberstellung wurden die Sequenzen als Diaporthe-Arten identifiziert. Darunter zu nennen sind *Diaporthe citri*, *Diaporthe phaseolorum*, *Diaporthe oncostoma* und *Seiridium*, welche Ascomyceten (Schlauchpilze) sind. Diese Pilze gelten generell als pflanzenpathogen, saprobiontisch und schwach parasitär. Damit wurde bestimmt, dass die Banden in den getesteten Proben mit dem Primerpaar Pilzfor 1 /ITS4 weder mit Basidiomyceten noch mit *Armillaria mellea* im Zusammenhang stehen.

Eine mögliche Ursache für die Kontamination der Robinien mit Diaporthe-Arten, sind Pilzsporen in der Luft oder im Bast, die bei der Einführung des Dübels in den Baumstamm getragen worden sind.

Das Fazit dieser vielseitigen Untersuchungen, in denen ein Nachweis von *Armillaria mellea* in den *Robinia pseudoacacia* Proben nicht erfolgte, war, dass neue spezifische Amtaxprimer herangezogen werden mussten. Die neue Primerwahl sollte Aufzeigen, ob die getesteten Robinien tatsächlich den Pilz *A. mellea* effektiv abgeschottet haben oder ob die Primer-Kombination Amtaxfor 1/Amtaxrev a nicht die optimale Verwendung für Amplifikationen der *A. mellea* Sequenz darstellt.

3.4.2 Festlegung eines weiteren Taxon-Primers für den Nachweis von *A. mellea* in *R. pseudoacacia* Proben im Hauptversuch

Der Vorversuch, in welchem die Robinienproben mit dem Taxon-Primer Amtaxfor 1/Amtaxrev a untersucht worden sind, hatte ergeben, dass keine *A. mellea* nachzuweisen war. Auch die Überprüfung intakter DNA in den Proben sowie der Einsatz pilzspezifischer Primer und Sequenzierungen, führte zu dem Ergebnis, dass *A. mellea* in den künstlich infizierten *R. pseudoacacia* Proben nicht ermittelt werden konnte. Um folglich ausschließen zu können, dass in den Baumproben bzw. PCR-Produkten tatsächlich keine *A. mellea* DNA vorhanden war, an welche der Taxon-Primer Amtaxfor 1/Amtaxrev a binden konnte, wurden die kultivierten Robinien mit einem weiteren Taxon-Primer geprüft.

Wie aus Abbildung 14 zu entnehmen ist, haben sich folgende Primer-Kombinationen ergeben, die eine gute Spezifität zur *Armillaria mellea* DNA haben, sofern diese im PCR-Produkt vorliegt:

- Amtaxfor 1/Amtaxrev b
- Amtaxfor b/Amtaxrev b
- Amtaxfor 1/Amtaxrev 1
- Amtaxfor a/Amtaxrev 1

Damit stellen sie eine geeignete Wahl für die weiteren Versuche dar. In diesem Zusammenhang wird die Spezifität des Taxon-Primer (Amtaxfor 1/Amtaxrev a) aus dem Vorversuch untersucht.

Als Template in der PCR wurden einerseits die Reinkultur von *A. mellea* und andererseits eine natürliche *A. mellea* infizierte Robinienprobe aus dem Freiland verwendet. Die Reinkultur übernimmt die Rolle der Positivkontrolle (Abbildung 21).

Die Negativkontrollen zeigen keine Banden, was dafür spricht, dass der Mastermix-Ansatz für die PCR frei von Kontamination war. Die Primer-Kombination Amtaxfor 1/Amtaxrev b soll – laut Tabelle 13 – eine Sequenzlänge von etwa 664 bp amplifizieren. Das Ergebnis sind jedoch Doppelbanden beim Template der Pilz-Reinkultur, auf der Höhe von 350 bp und 500 bp (Abbildung 21). In den Proben der natürlich infizierten Robinie aus dem Freiland ist keine Amplifikation erfolgt. Daraus lässt sich annehmen, dass der Taxon-Primer Amtaxfor 1/Amtaxrev b zwar DNA amplifiziert hat, nicht aber die vom gesuchten Pilz und somit nicht spezifisch an *A. mellea* bindet.

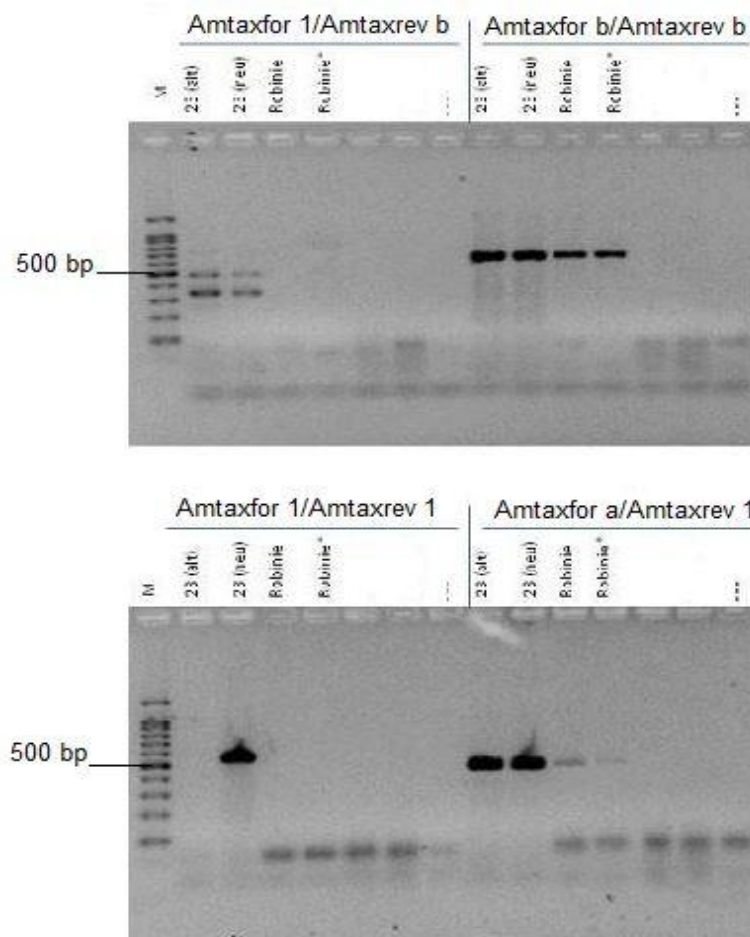


Abbildung 21: Darstellung der PCR Produkte von *Armillaria mellea* Reinkultur, künstlich infizierter *R. pseudoacacia* und natürlich infizierter *R. pseudoacacia* aus dem Freiland mit den Primer-Kombinationen: Amtaxfor 1/Amtaxrev b, Amtaxfor b/Amtaxrev b, Amtaxfor 1/Amtaxrev 1 und Amtaxfor a/Amtaxrev 1. Mit allen Amtax-Primer lassen sich *A. mellea* Sequenzen amplifizieren, besonders gut mit Amtaxfor b/Amtaxrev b. Die Negativkontrollen zeigen keine Amplifikation. Zum Längenabgleich dient ein 100 bp Marker.

Der Einsatz des Primer Amtaxfor b/Amtaxrev b zeigt auf dem Gelbild in jeder Probe eine klare Bande, in Höhe von etwa 650 bp. Diese Basenpaarlänge entspricht der zu amplifizierenden Länge laut Tabelle 13. Eine Amplifikation war in den *A. mellea* Reinkultur- und infizierten Robinienproben möglich. Dies deutet darauf hin, dass diese Primer-Kombination eine gute spezifische Bindung zur *A. mellea* DNA hat.

Das Resultat der PCR unter Verwendung dem Primer Amtaxfor 1/Amtaxrev 1 zeigt lediglich eine Bande, bei dem Template der *Armillaria mellea* Reinkulturprobe und zwar auf der Höhe von ca. 550 bp. Diese bp Länge entspricht ebenfalls den Angaben aus Tabelle 13. Da Amtaxfor 1/Amtaxrev 1 jedoch nur in einer Probe eine Amplifikation ermöglichte, wird angenommen, dass die Spezifität dieses Primerpaares, in Bezug auf den Pilz *A. mellea*, gering ist.

Mittels Amtaxfor a/Amtaxrev b sind vier Banden auf dem Gel zu erkennen – in jeder Probe eine. Zwei deutliche Banden beruhen auf der Amplifikation mit dem Template der Pilz-Reinkultur, die anderen zwei – etwas schwächeren Banden – beruhen auf der Amplifikation mit der DNA aus dem Template mit der natürlich infizierten Robinie. Die vier Banden liegen auf eine Höhe von etwa 460 bp (Tabelle 13).

Mit dieser Ergebnisreihe wurde entschieden Taxon-Primer Amtaxfor b/Amtaxrev b zur Überprüfung der Ergebnisse aus dem Vorversuch (Kapitel 3.4.1) zu verwenden, da nur mit dieser Primer-Kombination in jeder Probe eine Amplifikation erfolgte, die im Geldbild in jeder getesteten Probe eine Bande mit starker Intensität aufzeigte.

3.4.3 Nachweis von *A. mellea* in *R. pseudoacacia* Proben mit dem Taxon-Primer Amtaxfor b/Amtaxrev b im Hauptversuch

Um die Ergebnisse aus dem Vorversuch (Kapitel 4.3.1) mit Amtaxfor 1/Amtaxrev a zu bestätigen bzw. zu widerlegen, wurden mit Hilfe des spezifischen Primers Amtaxfor b/Amtaxrev b die Robinenproben auf den schädlichen Erreger *A. mellea* untersucht.

Von den acht analysierten Bäumen, sind für vier Bäume die Ergebnisse der Gelelektrophorese in Abbildung 22 und 23 exemplarisch dargestellt. Die DNA-Länge, welche in der PCR mittel Amtaxfor b/Amtaxrev b vervielfältigt worden ist und im PCR-Produkt vorliegt, kann anhand der Gele aus der Elektrophorese abgelesen werden. Abbildung 22 zeigt die Gele der Robinien #3 und #5, welche im Winter mit *A. mellea* infiziert wurden und Abbildung 23 zeigt die im Sommer inokulierten Bäume #8 und #10. Beide Abbildungen inkludieren den Stressfaktor der Trockenheit.

Die in Abbildung. 22 dargestellten Proben #3 und #5 wurden im Februar inokuliert. Baum #5 war „well watered“, wobei Baum #3 trockengestresst war. Mit dem Einsatz des Primers Amtaxfor b/Amtaxrev b waren in den beiden Robinienproben Amplifikationen möglich. In beiden dargestellten Gelen ist in der Negativprobe keine Bande zu erkennen, was dafür spricht, dass der eingesetzte Mastermix-Ansatz frei von Kontamination war.

Im trockengestressten Baum #3 ist bei den Proben CO, InS, InS* InD*In und InR* jeweils eine Bande zu sehen. Die Proben, in welchen es zur Amplifikation kam, sind aus der Kontrollgruppe des Kallus Bereichs und aus der inokulierten Probe aus der Sound-Zone, Decay-Zone und Reaction-Zone. Alle fünf Banden liegen auf der Höhe von etwa 700 bp. Diese stimmt mit der zu amplifizierenden Sequenzlänge des Primers Amtaxfor b/Amtaxrev b (Tabelle 13) und der Positivkontrolle, in welcher sich das Template der Reinkultur von *A. mellea* befindet, überein (Abbildung 22). Da es sehr unwahrscheinlich ist, dass sich in der Kontrolle im Kallus *A. mellea* befindet, wird angenommen, dass ein Fehler in der Beschriftung erfolgte und es sich hierbei um eine inokulierte Probe handelt. Diese Annahme wird durch die Tatsache gestützt, dass es bei den trockengestressten Robinien zum Inokulationszeitraum Februar zu keiner Kallusbildung kam (Tabelle 10).

Anhand des Gelbildes der gut bewässerten Probe #5 sind ebenfalls Amplifikationen zu erkennen. Jeweils eine Bande ist in den Proben CR und InO erkennbar. Dies sind Proben der Kontrollgruppe aus der Reaction-Zone und der inokulierten Probe aus dem Kallus Bereich. Die zwei Banden befinden sich auf paralleler Höhe zur Positivkontrolle, bei etwa 690 bp (Abbildung 22). Diese amplifizierte Sequenzlänge stimmt ebenfalls mit der berechneten Länge aus Tabelle 13 überein.

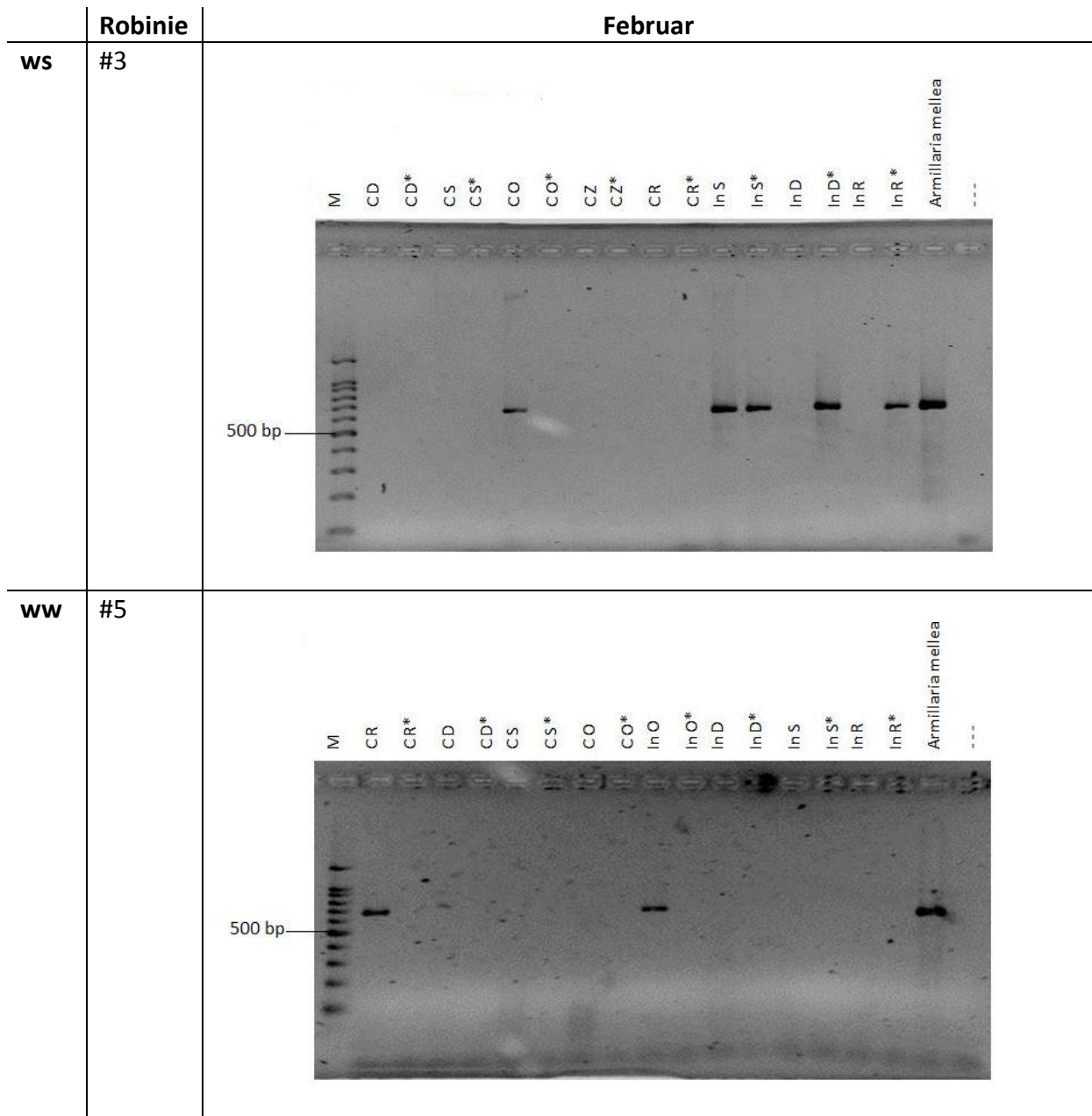


Abbildung 22: Darstellung der PCR-Produkte der Baumprobe #3 ws Feb. und #5 ww Feb. mit dem Primer Amtaxfor b/Amtaxrev b. In = Inoculated, C = Control, R = Reaction Zone; D = Decay Zone, Z=Scattered Zone, O = Callus, Dü = Dübel, S = Sound Zone. Proben der Robinie #3 ws Feb. zeigen Amplifikationen in den Zonen: CO, InS, InS*, InD, InR. Proben der Robinie #5 ww Feb. zeigen Amplifikationen in den Zonen CR und InO. Zum Längenabgleich dient ein 100 bp Marker.

Die beiden, in Abb. 23, dargestellten Proben #8 und #10 wurden im Juli inokuliert. Baum #10 war „well watered“, wobei Baum #8 trockengestresst war. Mit dem Einsatz des Primers Amtaxfor b/Amtaxrev b waren in den beiden Robinien keine Amplifikationen möglich. In beiden dargestellten Gelen ist in der Negativprobe keine Bande zu erkennen, was dafür spricht, dass der eingesetzte Mastermix-Ansatz frei von Kontamination war.

In dem Gelbild des trockengestressten Baumes #8 sowie des gut bewässerten Baumes #10 ist in keinen Proben eine Bande zu sehen. Nur in der Positivkontrolle, welche als Template die *A. mellea* Reinkultur enthielt, kam es zur Amplifikation (Abbildung 23) Die Banden

befinden sich auf der Höhe von etwa 650 bp und stimmen mit der von Amtaxfor b/Amtaxrev b zu amplifizierenden Sequenzlänge überein (Tabelle 13).

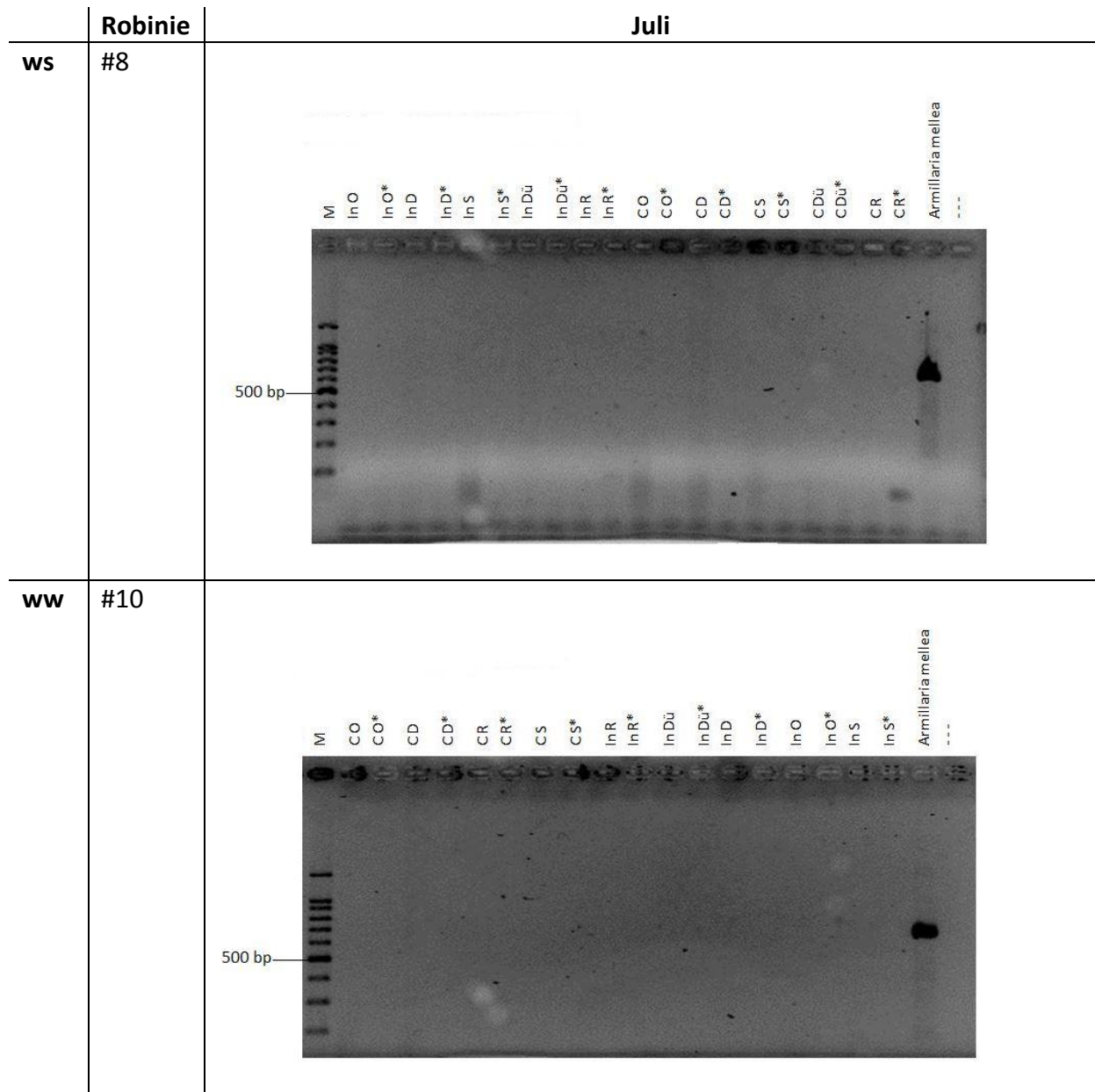


Abbildung 23: Darstellung der PCR-Produkte der Baumprobe #8 ws Juli und #10 ww Juli mit dem Primer Amtaxfor b/Amtaxrev b. In = Inoculated, C = Control, R = Reaction-Zone; D = Decay-Zone, Z=Scattered-Zone, O = Callus, Dü = Dübel, S = Sound-Zone. Bis auf die Positivprobe, kam es zu keinen Amplifikationen. Zum Längenabgleich dient ein 100 bp Marker.

Aufgrund der Amplifikationen in den *Robinia pseudoacacia* Proben, welche im Winter mit *A. mellea* infiziert worden sind, kann der Nachweis von *A. mellea* in diesen Proben als positiv betrachtet werden.

In den *R. pseudoacacia* Proben, welche im Sommer mit dem Pilz infiziert worden sind und keine Banden im Gel zeigen, konnte der schädliche Erreger nicht nachgewiesen werden.

In Tabelle 15 sind die Ergebnisse für das Vorhandensein von *A. mellea* in den untersuchten Robinien dargestellt. Die Tabelle zeigt alle acht analysierten Bäume. Vier der acht Robinien (#4, #5, #10, #11) wurden gut bewässert (ww) und vier trockengestresst (#3, #4, #8, #9, ws). Ebenfalls wurden vier der acht Bäume im Sommer (Juli) mit dem Pilz infiziert (ww: #10, #11, ws: #8, #9) und die anderen vier im Winter (Februar) (ww: #3, #5, ws: #3, #4). Alle Ergebnisse der untersuchten Zonen (Kallus, Dübel, Decay-Zone, Scattered-Zone, Reaction-Zone und Sound-Zone) sind ebenfalls nach Kontrollproben und inokulierten Proben in Tabelle 15 aufgelistet.

Die rot markierten Stellen dieser Tabelle weisen darauf hin, in welchen Proben eine Zone für weitere Untersuchungen nicht vorlag. Zonen wie der Dübel, sind zum Probenahmezeitpunkt schon so zersetzt worden, dass eine weitere Verarbeitung dieser nicht möglich war. Und Bereiche wie die Scattered-Zone wurden nur von einer Robinie (#3 ws) ausgebildet. Die grün markierten Bereiche zeigen die Zonen, in welchen *Armillaria mellea* nachgewiesen werden konnte. Die weiß gebliebenen Felder in der Tabelle 15 zeigen die Zonen, in welchen kein Vorkommen von *A. mellea* nachgewiesen werden konnte.

Auffallend sind die Ergebnisse der im Sommer (Juli) mit *A. mellea* infizierten Bäumen. Dabei werden sowohl die gut bewässerten, wie trockengestressten Proben betrachtet. In diesen vier Robinien (#8, #9, #10, #11) konnte in keiner Zone *A. mellea* nachgewiesen werden.

In den im Winter inokulierten Bäumen (ww: #4, #5; ws: #3, #4) konnte der pathogene Pilz *A. mellea* nachgewiesen werden. In den gut bewässerten Proben (#4, #5) konnte insgesamt fünf Vorkommen des *A. mellea*, mittels des Primers Amtaxfor b/Amtaxrev b, detektiert werden. Ermittelt wurde der pathogene Erreger im Kallus und Dübel sowie in der Reaction- und Sound-Zone. Im Vergleich dazu, konnten in den zwei trockengestressten Robinien (#3, #4) mehr Zonen ermittelt werden, in denen *A. mellea* Vorkommen nachzuweisen war. Insgesamt zehn *Armillaria mellea* Nachweise, also doppelt so viel wie in den gut bewässerten im Winter infizierten Robinien. Nachweisbar war der Pilz im Kallus und Dübel sowie in der Decay-, Reaction- und Sound-Zone.

Tabelle 15: Zusammenfassung der PCR-Ergebnisse der acht analysierten, künstlich infizierten Robinen unter dem Einsatz des Taxon-Primers Amtaxfor b/Amtaxrev b. Rot markierte Bereiche zeigen Proben an, die für eine Untersuchung nicht zur Verfügung standen. Grün markierte Bereichen zeigen Proben an, mit denen ein positiver Nachweis von *A. mellea* mit Amtaxfor b/Amtaxrev b möglich war

	#	Zonen																					
		Kontrolle												Inokuliert									
		O	O*	D	D*	Z	Z*	R	R*	S	S*	Dü	Dü*	O	O*	D	D*	R	R*	S	S*	Dü	Dü*
ww																							
Feb.	4	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	
	5	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	X	X	+	-	-	-	+	-	-	-	X	X
Juli	10	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	11	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ws																							
Feb.	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	+	-	-	+	-	+	+	+	X	X
	4	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+
Juli	8	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	9	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Zur Veranschaulichung der tabellarischen Ergebnisse (Tabelle 15), wurde Abbildung 24 gestaltet. Die Abbildung zeigt vier schematische Querschnitte der Robinie mit den jeweils untersuchten Bereichen. Jede Querschnitts-Abbildung beinhaltet Informationen über den jeweiligen Inokulationszeitpunkt (Feb., Jul.) und Wasserversorgungszustand (ww, ws). Pro Baumquerschnitt werden die Ergebnisse der inokulierten und Kontrollproben gezeigt. Dabei geben die gelb markierten Bereiche den Nachweis von *A. mellea* in der entsprechend gekennzeichneten Zone wieder (Tabelle 15).

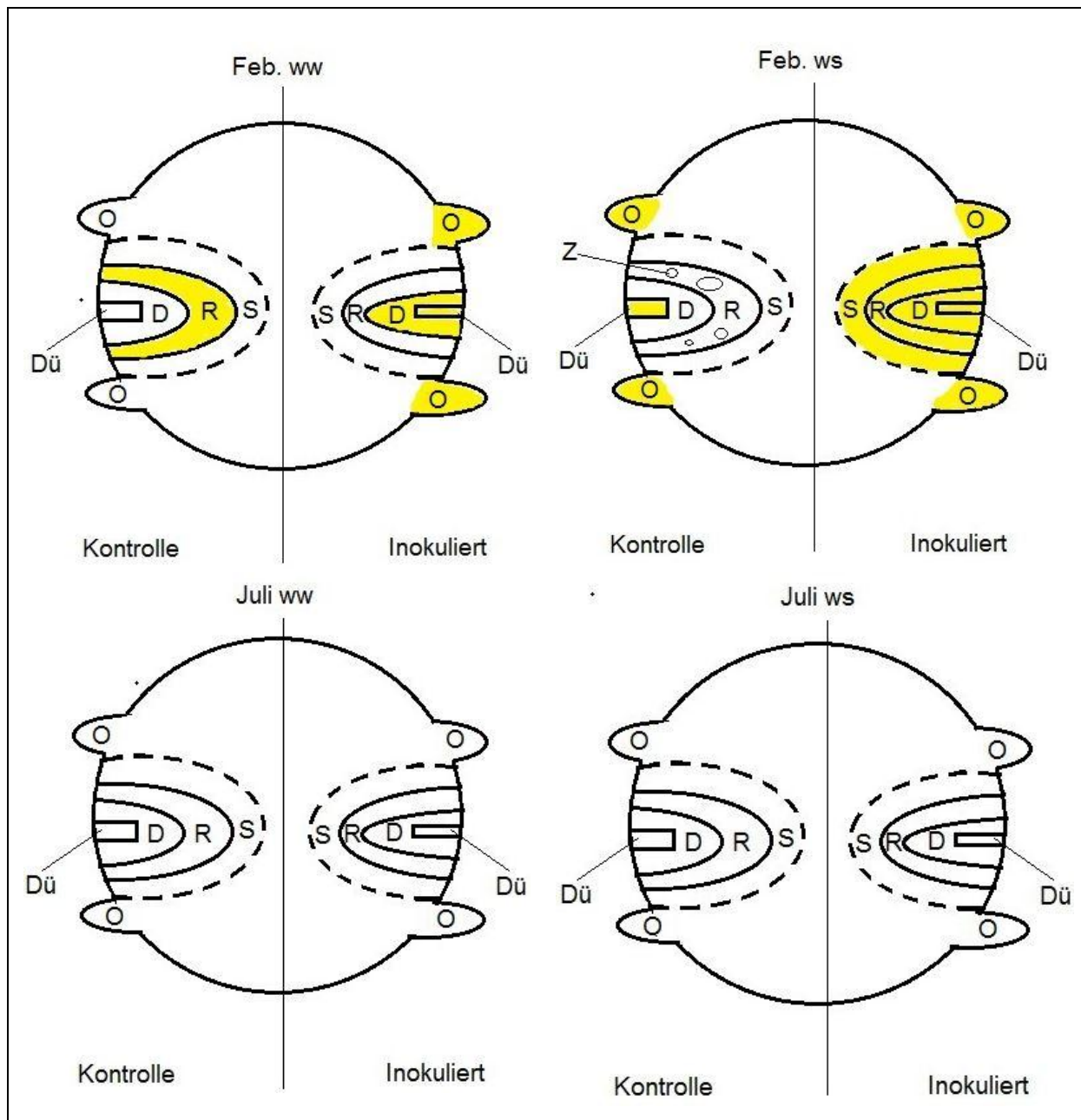


Abbildung 24: Grafische Darstellung des Querschnittes des Stammes der Robinie mit den jeweiligen Zonen Dü=Dübel, O=Callus, D=Decay-Zone, R=Reaktion-Zone, Z=Scattered-Zone, S=Sound-Zone, ww=well watered, ws=water stressed. Gelbe Markierungen zeigen die Zonen an, in denen *Armillaria mellea* DNA mit Hilfe der spezifisch entwickelten Taxon-Primer Amtaxfor b/Amtaxrev b amplifiziert werden konnte.

Mit Hilfe dieser Abbildung wird nochmal deutlich dass sich der Pilz nur in den im Winter künstlich infizierten Robinien etablieren konnte. Auch ist gut zu erkennen, dass der schädliche Erreger bei den trockengestressten Proben viel tiefer in den Baum eindringen konnte, als bei gut bewässerten.

Laut dem CODIT-Prinzip werden Schadorganismen an ihrer Ausbreitung im Baum gehindert, indem dieser eine Grenzschicht (Reaktionszone) ausbildet und somit den gesunden vom beschädigten Teil abgrenzt (Kompartimentierung). Den Ergebnissen folgend (Tabelle 15), konnten nicht alle Robinien den infizierten Pilz in seiner Ausbreitung hindern. Das ermöglicht einen Vergleich mit der Arbeit von Müller-Navarra 2010, in welcher *Robinia pseudoacacia* künstlich mit *Laetiporus sulphureus* und *Phellinus robiniae* infiziert wurde und unter verschiedenen Erntezeiten untersucht worden ist. Entscheidend dabei ist, dass keiner der genannten Pilze sich im infizierten Baum nach 360 Tagen Erntezeit etablieren konnte. Je nach Pilzart war die Übergangszone (zwischen Reaktionszone und gesundem Splintholz) nach 90 oder bereits nach 30 Tagen frei von inokulierten Pilzen (Müller-Navarra, 2010).

Müller-Navarra nennt hierzu einige mögliche Gründe, wie antagonische Wirkung zwischen ermittelten *Fungi imperfecti* und des *P. robiniae*, sowie die bevorzugte Besiedlung von Wunden durch Höhere Pilze als Niedere (Shigo, 1984). Dieser Vergleich lässt annehmen, dass *A. mellea* eine höhere Resistenz gegenüber der Reaktionstoxine im Baum aufweist, als *Laetiporus sulphureus* und *Phellinus robiniae* und somit nicht nur in den von der Grenzschicht eingedämmten Zonen nachgewiesen wurde.

Es ist jedoch zu beachten, dass die *A. mellea* infizierten Robinien anderen Konditionen ausgesetzt waren, als bei Müller-Navarra (2010). Bewässerungsumstände, unterschiedliche Jahreszeiten denen Temperatur und Lichtverhältnisse als wichtigste Faktoren vorangehen, könnten die Etablierung der inokulierten Pilze beeinflussen. Unter diesem Gesichtspunkt zeigt die vorliegende Arbeit deutlich, dass *A. mellea* sich in den Proben der Juli Erntezeit nicht durchsetzen konnte und eine erfolgreiche Eindämmung bzw. Zersetzung des *A. mellea* erfolgte. Eine Erklärung wäre, dass in der Wachstumsession von März bis August die Abschottung im Holz am besten ist und die Wärme, welche für die Bildung von Abwehrstoffen, wie Phenole, benötigt wird, zu diesem Zeitpunkt der Sommerernste gegeben war (Dujesiefken und Liese, 2008).

Speicherstoffe die zur Wundreaktion beitragen, unterliegen in Art, Menge und Mobilisierbarkeit einem ausgeprägten jahreszeitlichen Wechsel und beeinflussen somit in starkem Maße die Reaktionsmöglichkeiten von Bäumen nach Verletzung. So zeigen sich Reaktionen vor allem im Frühjahr und Sommer und passen mit den vorliegenden Ergebnissen überein.

Allgemein sind Wundreaktionen in kälteren Perioden schwächer als zu anderen Zeiten. Dies würde den stärkeren pathogenen Pilzbefall im Februar Erntezeitraum begründen.

Ebenso der Regeneinfluss – innerhalb gleicher Monate – ist relevant. Die Resultate zeigen, dass die Abwehrreaktion trockengestresster Pflanzen desselben Erntezeitraums gemindert ist und *A. mellea* viel tiefer in die Robinenschichten eindringen konnte.

In Tabelle 16 ist ein Überblick der Proben aus dem Februar Erntezeitraum sowie deren zwei Wasserversorgungszuständen gegeben. In der Tabelle sind Zonen, in denen *A. mellea* nachgewiesen worden ist, grün markiert.

Tabelle 16: Übersicht der Zonen in denen *A. mellea* nachgewiesen wurde. Dargestellt sind Proben des Februar Erntezeitraumes, eingeteilt nach dem Wasserversorgungszustandes ww (well watered) und ws (water stressed)

	#	Zone				
		In Dü	In O	In D	In R	In S
Februar ww	4	+	+	-	-	-
	5	+	+	-	-	-
Februar ws	3	+	+	+	-	-
	4	+	+	+	+	+

Diese Darstellung zeigt deutlich, dass der Pilz in trockengestressten Robinien, selbst in die tiefer gelegenen Schichten, eindringen konnte. Bei Trockenheit bzw. geringerer Bewässerung kann der Wassergehalt im Holz sinken, wodurch die Aktivität des Kambium abnimmt und Zellteilungsprozesse eingeschränkt werden bzw. aus bleiben und Abschottungsreaktionen gemindert werden oder komplett versagen (Weber, 2002).

Diese Feststellung deutet darauf hin, dass die analysierten Robinien unter den in dieser Arbeit ausgesetzten Stressfaktoren, wie Jahreszeitpunkt der künstlichen Inokulation mit dem pathogenen Pilz *A. mellea* und die Verminderte Wasserversorgung eine Schwächung ihrer Abwehrreaktion gegenüber schädlichen Organismen induzierte und somit keine effektive Barriere zum Schutz aufgebaut bzw. aufrecht erhalten werden können.

3.4.4 Bestätigung der Spezifität des Taxon-Primers Amtaxfor b/Amtaxrev b mittels Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR wurde angewandt, um die mit Amtaxfor b/Amtaxrev erbrachten Ergebnisse, zu bestätigen. Die qPCR arbeitet wesentlich sensitiver als die klassische PCR (Kapitel 2.3.5). Mit Hilfe dieser sollte abgesichert werden, dass sich in den Proben, in denen bisher keine *A. mellea* nachgewiesen wurde, tatsächlich keine DNA des Pilzes befindet und der Taxon-Primer Amtaxfor b/Amtaxrev b spezifisch bindet.

Da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt aufweist als unspezifische Amplifikate, ist eine Unterscheidung möglich. Die Höhe des Schmelzkurven-Peaks gibt verglichen mit mitgeführten Standards eine annähernde Auskunft über die Menge des gebildeten Fragments. Abbildung 25 zeigt das Ergebnis der Schmelzpunktanalyse exemplarisch am Baum #8 ws Februar.

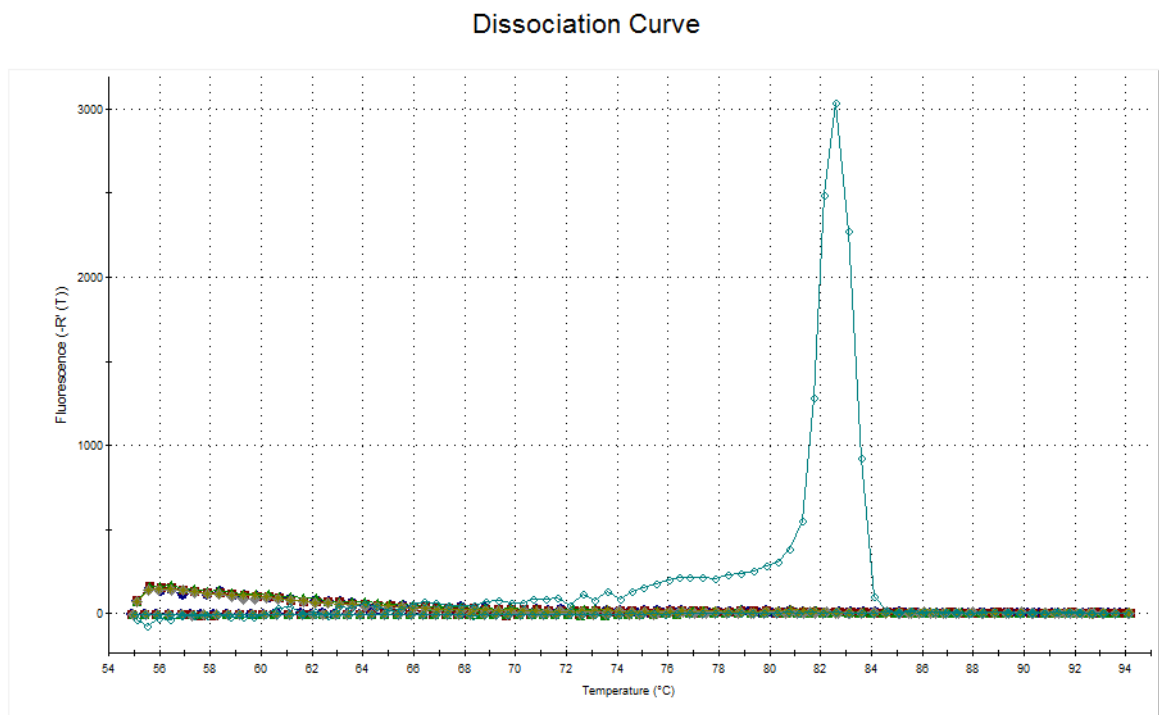


Abbildung 25: Dissoziationskurve der qPCR der Robinie #8 ws Feb. mit dem Primer Amtaxfor b/Amtaxrev b. Zu erkennen ist nur der Peak der Positivkontrolle bei der Schmelztemperatur von etwa 82,5°C und einer Fluoreszenz bei 3000.

In Abbildung 24 ist nur ein Peak zu erkennen. Dieser ist die Positivkontrolle in der sich das Amplifikat, welches *A. mellea* DNA enthielt, befand. Das Fluoreszenzsignal stieg bis auf 3000 an. Dieser Wert kam zustande, indem der Primer Amtaxfor b/Amtaxrev b in großer Vielzahl an die zu amplifizierende Sequenz gebunden hatte. Dadurch entstanden DNA-Doppelstränge, in denen der Farbstoff interkalieren konnte und das Signal ansteigen ließ.

Bis auf den Peak der *Armillaria mellea* Positivkontrolle bei etwa 82,5°C und einer Fluoreszenz von 3000 sind keine weiteren Peaks zu erkennen. Dies bedeutet, dass keine weiteren Bindungen zwischen der Primer-Kombination und den DNA-Proben aus den Zonen der Robinie #8 ws stattgefunden haben. Im vorderen Bereich der Kurvenverläufe sind keine Unebenheiten bzw. kleinere Peaks zu erkennen. Daraus schließt sich, dass die Negativprobe (Mastermix-Ansatz) frei von Kontaminationen war.

Da der Primer Amtaxfor b/ Amtaxrev b an die Pilz-DNA in der Positivkontrolle gebunden hatte, jedoch keine weiteren Peaks zu ermitteln waren, war dies eine Bestätigung dafür, dass die Bindungen zwischen dem spezifischen Amtax-Primer und der *Armillaria mellea* Sequenzen spezifisch erfolgten und an dem hier mitgeführten Beispiel keine *A. mellea* nachgewiesen werden.

Aufgrund der Intensität des Peaks, der Messung dass der Taxon-Primer an die Positivkontrolle gebunden hatte und dem Ergebnis, dass keine weiteren Bindungen eingegangen waren, konnte bestätigt werden, dass der Primer Amtaxfor b/Amtaxrev b spezifisch an *A. mellea* gebunden hatte und sich somit in der Robinie #8 ws Feb. keine *A. mellea* nachweisen ließ.

4. Fazit

Im Laufe der Arbeit konnte – mittels spezifisch erstellten Taxon-Primer – die Ausbreitung des pathogenen Pilzes in künstlich infizierter Robinie ermittelt werden. Indem jede einzelne Zone der Bäume auf das Vorhandensein des inokulierten Pilzes untersucht worden ist, lässt sich ein Aufschluss über die Effizienz der Abschottung gegenüber Pilzschäden im Baum erarbeiten. Die Einteilung der Zonen richtet sich nach dem in Kapitel 1.4 beschriebenen CODIT-Prinzip und ist in Abbildung 8 aufgeführt.

Durch die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse, lässt sich festhalten, dass für eine effektive Abschottung von *Robinia pseudoacacia* gegenüber *Armillaria mellea*, die Jahreszeit eines Befalls mit *A. mellea* ein wichtiger Faktor ist. Im Zeitraum der Wachstumsession ist der Baum in der Lage die Infizierung des Pilzes abzuwehren. In kälteren Jahresperioden hingegen nimmt der Abwehrmechanismus ab und das Eindringen des schädlichen Organismus wird erleichtert. *Armillaria mellea* konnte sich nur in den im Winter künstlich infizierten Robinien etablieren. Somit nimmt der klimatische Zeitpunkt eines Pilzangriffes auf *R. pseudoacacia* in Bezug auf die Abwehrreaktion des Baumes einen großen Stellenwert ein.

Im Vergleich dazu ist der Zustand der Wasserversorgung zweitrangig. Trotz schlechter Wasserbedingungen konnten Robinien, welche zum Sommerzeitpunkt inokuliert worden sind, den Pilzbefall verhindern.

Dennoch übte der trockengestresste Zustand der Bäume ebenfalls einen negativen Effekt auf die Abschottungseffizienz der *R. pseudoacacia* aus. Der zusätzliche Stressfaktor des Wassermangels, führte zu einer verstärkten Verminderung der Abwehrreaktion in den Bäumen und begünstigte somit die Besiedlung tieferer Baumschichten mit dem Pilz *A. mellea*.

Die Anwendung der Faktoren der limitierten Wasserversorgung und des Infektionszeitraumes haben gezeigt, dass es sich hierbei eindeutig um Stressfaktoren handelt. Angewandt auf die mit *Armillaria mellea* künstlich infizierten *Robinia pseudoacacia* ist eine mangelhafte Abwehrreaktion gegenüber dem Pilz festzustellen. Diese konnte mit Hilfe der entwickelten spezifischen Taxon Primer nachgewiesen werden.

Literaturverzeichnis

Arya[†] M., Shergill I., Williamson M., Gommersall L., Arya N. und Patel H. (2005) Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 5(2), 209-219

Aslam Jabeen (2014), unveröffentlicht

Baldwin B. G., Sanderson M., Porter M., Wojciechowski M., Campbell C. und Donoghue M. (1995) The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 247-277

Bavendamm W. (1974) Die Holzschäden und ihre Verhütung. Wissenschaftliche Verlagsanstalt Stuttgart

Clark D.P. und Pazdernik N.J. (2009) Molekulare Biotechnologie - Grundlagen und Anwendungen. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Collin S. (2014) Trockenheit im Wald. Artikel der FVA Redaktion, Deutschland

Dieffenbach C. W., Lowe T. M. und Dveksler G. S. (1993) General concepts for PCR primer design. In: *Genome Research* (3), S. 30–37

Dujesiefken D. (1995) Wundbehandlung an Bäumen. Thalacker, Braunschweig

Dujesiefken D. und Liese W. (2008) Das CODIT-Prinzip. Von den Bäumen lernen für eine fachgerechte Bazmpflege. Jaymarket Media GmbH & Co. KG

Feliner G.N. und Rosselló J.A. (2007) Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44 (2):911-919

Führer, E. (2005) Robinienwirtschaft in Ungarn. Die Robinie im praktischen Waldbau. *Forst und Holz* 60, 464-466

Gardes M. und Bruns T. D. (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology Notes* 2(2), 113-118

Göhre, K. (1952) Die Robinie und ihr Holz - Deutscher Bauernverlag Berlin

Hanssen F., Wischnewski N., Moreth U. und Magel E.A. (2011) Molecular identification of *Fitzroya cupressoides*, *Sequoia sempervirens*, and *Thuja plicata* wood using taxon-specific rDNA-ITS primers. *IAWA Journal* 32 (2):273-284

Holzappel B. und Wickert L. (2007) Methoden und Anwendungsgebiete - Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

- Krausch, H.-D.** (2001): Einführung und Ausbreitung der Robinie in Europa. - Beiträge zur Gehölkunde: 107-115
- Larkin M. A.** (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. In: Bioinformatics. Bd. 23, S. 2947-2948. PMID 17846036
- Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D. und Darnell J.E.** (2001) Molekulare Zellbiologie, 4. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Magel E.; Busch H.; Fischer I. und Moreth U.** (2007) Sucrose cleaving enzymes in the wood of *Robinia pseudoacacia* during the infection with pathogenic fungi, Hamburg
- Lange H., Moreth U.; Magel E.** (2008) Functional genetics and biochemistry of formation and deposition of accessory compounds during heartwood formation and discoloration for wood quality and wood use. Institute für Holzforschung
- Molnar S.** (1989) Forschungsergebnisse über die Untersuchung der Holzeigenschaften von *Robinia pseudoacacia* - Acta Facultas Ligniensis, Sopron
- Matyssek R., Fromm J., Rennenberg H. und Roloff A.** (2010) Biologie der Bäume – Von der Zelle zur globalen Ebene. 1. Auflage UTB GmbH, Ulmer Eugen Verlag, Stuttgart
- Müller H.J.** (2001) PCR – Polymerase-Kettenreaktion. Das Methodenbuch, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Müller-Navarra A.** (2010) Untersuchung der Effizienz der Pathogenabwehr bei *Robinia pseudoacacia* (L.) nach Inokulation mit *Laetiporus sulphureus*[(Bull) Murrill] und *Phellinus robiniae* [(Murrill) Ames]. Bachelorarbeit, Universität Hamburg
- Nierhaus-Wunderwald D.** (1994) Die Hallimasch-Arten. Biologie und vorbeugende Massnahmen. In: Merkblatt für die Praxis 21. Eidgenössische Forschungsanstalt für Wald, Schnee und Landschaft (WSL), Birmensdorf (Schweiz)
- Nierhaus-Wunderwald D., Engesser R. und Rigling D.** (2012) Hallimasch – Biologie und forstliche Bedeutung. Merkblatt für die Praxis. 2. Überarbeitete Auflage Eidg. Forschungsanstalt WSL, CH-8903 Birmensdorf
- Noack D. und Schwab E.** (1988) Quell- und Schwindmaße von Robinie. Springer Verlag
- Ririe K., Rasmussen R. und Wittwer C.** (1996) Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. Analytical Biochemistry 245, 154-160. Article No. AB969916
- Roll Hansen F.** (1985). European Journal of Forest Pathology Volume 15, Issue 1, pages 22–31. John Wiley & Sons, Inc
- Sambrook J. und Russell D. W.** (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Band 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press

- Schwarze F.W.M.R., Engels J. und Mattheck C.** (1999) Holzzeretzende Pilze in Bäumen. Rombach GmbH Druck- und Verlagshaus, Freiburg im Breisgau
- Shaw C.G. und Kile A.** (1991). Armillaria Root Disease. Agricultural Handbook No. 691, USDA Forest Service, Washington, USA
- Shigo A.L. und Marx H.G.** (1977) Compartmentalization of decay in trees. USDA For. Serv. Agric. Inform. Bull. No. 405
- Shigo A. L.** (1984) Compartmentalization: A conceptual framework for understanding how trees grow and defend themselves. Ann. Rev. Phytopathol. 22, 189–214
- Shortle W. C. und Smith K. T.** (1990) Decay column boundary layer formation in maple. Biodeterioration Res 3: 377-389
- Stephenson F.H.** (2005) Mathematik im Labor. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Weber P.** (2002) Holzbiologie Teil 3. Professur Holzwissenschaften ETH Zentrum HG F 21
- Witzel J. und Martin J. A.** (2008) Phenolic metabolites in the resistance of northern forest trees to pathogens — past experiences and future prospects. Can. J. For. Res. Vol. 38. NRC, Canada
- White T.J., Bruns T., Lee S. und Taylor J.** (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: a guide to Methods and Applications (Academic Press, San Diego):315-322
- Zhang W., Wendel J. F. und Clark L. G.** (1997) Bamboozled again! Inadvertent isolation of fungal rDNA sequences from bamboos (Poaceae: Bambusoideae). Molecular Phylogenetics and Evolution 8 (2):205-217

Quellenverzeichnis

http://www.baumkunde.de/Robinia_pseudoacacia/

<http://unser-kraeutergarten.at/heilkraeuter-lexikon/robinie/1019>

http://www.mushroomtable.com/wild/images/honey_fungus.jpg

<http://www.digitalefolien.de/biologie/umwelt/wald/stamm2.gif>

http://www.baumpfleger.at/image_2/codid_1.jpg

http://www.biorbyt.com/media/catalog/product/cache/1/large/040ec09b1e35df139433887a97daa66f/1/_/1_tae_agarose_gel.jpg

<http://www.mwg-biotech.com/>

Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema „Molekulargenetischer Nachweis des pathogenen Pilzes *Armillaria mellea* in künstlich infizierter *Robinia pseudoacacia*“ ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Hamburg, 17. Juli 2014

Corinna Gebarowski