

Diplomarbeit

vorgelegt zur Erlangung des Grades eines Diplom-Biologen an der
Fakultät für Biologie und Biotechnologie der
Ruhr-Universität Bochum



Phylogenie der Brandpilzgattung *Urocystis*

von

Sascha Lotze-Engelhard

Angefertigt im LS Evolution und Biodiversität der Pflanzen,

AG Geobotanik

Bochum im Dezember 2010

Referent: Prof. Dr. D. Begerow

Koreferent: Prof. Dr. R. Tollrian

'Fungi have a profound impact on global ecosystems. They modify our habitats and are essential for many ecosystem functions. Fungi form soil, recycle nutrients, decay wood, enhance plant growth and cull plants from their environment. They feed us, poison us, parasitize us and cure us. They destroy our crops, homes and libraries, but they also produce valuable biochemicals, such as ethanol and antibiotics. For both practical and intellectual reasons it is important to provide a phylogeny of Fungi on which a classification can be firmly based.'

(Blackwell u.a. 2006)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung	9
1.1 Systematik der Gattung Urocystis	9
1.1.1 Allgemeines zu Pilzen	9
1.1.2 Basidiomyceten	9
1.1.3 Ustilaginomycotina.....	10
1.1.4 Urocystales	13
1.1.5 Urocystaceae.....	13
1.1.6 Urocystis.....	14
1.2 Molekularphylogenetische Marker.....	16
1.2.1 Marker des Kerngenoms.....	17
1.2.2 Marker der ribosomalen DNA (rRNA)	18
1.2.3 Marker der mitochondrialen DNA (mtDNA).....	20
1.3 Ziele der Arbeit.....	21
2 Material	22
2.1 Materialien:.....	22
2.1.1 Sequenzen von GenBank.....	22
2.1.2 Untersuchungsmaterial:	22
2.1.3 Verbrauchsmaterialien, Kits und Reagenzien	28
2.1.4 Geräte:	29
2.1.5 Software.....	31
2.1.6 Software – Freeware.....	32
2.1.7 Lösungen und Puffer	33
2.1.8 Oligonukleotide	34
3 Methoden.....	36
3.1 Die molekularbiologischen Methoden:	36
3.1.1 Die Isolierung genomischer DNA:.....	36
3.1.2 Design von Oligonukleotiden.....	37
3.1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	37
3.1.4 Nested-PCR:	38
3.1.5 Agarosegel-Elektrophorese	40

3.1.6	Trennen von Doppelbanden	41
3.1.7	Aufreinigung der PCR-Produkte	42
3.1.8	Messung des DNA-Gehaltes der PCR-Produkte	42
3.1.9	DNA-Sequenzierung	42
3.2	Methoden der Bioinformatik	42
3.2.1	Assembling	43
3.2.2	die Überprüfung der gewonnenen Sequenzen	43
3.2.3	Die Alignierung der Sequenzen	44
3.2.4	Überprüfung der Alignments	44
3.2.5	Auswahl der Substitutionsmodelle	45
3.2.6	Das Neighbour-Joining	47
3.2.7	Bootstrapping	47
3.2.8	Maximum Parsimonyanalyse (MP)	48
3.2.9	Maximum-Likelihood-Verfahren (ML)	48
3.2.10	Die Bayessche Statistik (Bay)	49
4	Ergebnisse	51
4.1	Ergebnisse der PCR	51
4.1.1	Internal Transcribed Spacer (ITS)	51
4.1.2	Large Subunit (LSU)	51
4.1.3	Translation Elongation Factor 1 α (tef1):	52
4.1.4	Left Border A Locus (lba)	52
4.1.5	Andere Regionen:	52
4.2	Phylogenetische Rekonstruktion	52
4.2.1	Ergebnisse der lba-Analyse	53
4.2.2	Ergebnisse der Multigen-Analysen	53
4.2.3	Ergebnisse der ITS-Analysen	60
4.2.4	Ergebnisse der LSU-Analysen	64
4.2.5	Ergebnisse der TEF1 alpha-Analysen	68
4.3	Ergebnisse Morphologie	73
5	Diskussion	75
5.1	Anmerkung zu den DNA-Isolationen	75
5.2	Gen-Marker	76
5.3	Phylogenie der Gattung <i>Urocystis</i>	81
5.4	Neuordnung der Gattung <i>Urocystis</i>	87
6	Zusammenfassung	90
7	Literaturverzeichnis	91
8	Anhang	96
	Anhang 1: PCR-Programme	96

Anhang 2: Exemplarisches Multigen-Alignment.....	102
Anhang 3: benutzte Kommandos der einzelnen Phylogenie-programme.....	103
Anhang 4: Maximum-Likelihood-Analyse der LBA-Region.....	106
Anhang 5: Gesamtverzeichnis der Gattung <i>Urocystis</i> des Herbariums Görlitz (GLM).....	107
Anhang 6: Grafische Darstellung der verwendeten Alignments.....	109
Anhang 7: Auflistung der europäischen <i>Urocystis</i> -Arten mit ihren Wirtspflanzen (nach Vánky 1994).....	110
Anhang 8: Korrelation Sporenkategorie und Wirtszugehörigkeit bei der Gattung <i>Urocystis</i>	117
9 Danksagung.....	118
10 Erklärung.....	119

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: generalisierter Lebenszyklus der Brandpilze	12
Abb. 2: Schema einer rRNA-Einheit Für SSU, ITS, LSU, IGS	18
Abb. 3: systematische Darstellung der LSU-rDNA	20
Abb. 4: Schema der Oligonukleotid-Bindestellen bei einer Nested PCR	39
Abb. 5: Arbeitsabläufe Bioinformatik	43
Abb. 6: Substitutionen	45
Abb. 7: Anfang NJ-Analyse	47
Abb. 8: Schema Baumsuche in MrBayes	49
Abb. 9: Maximum-Parsimony-Analyse des Multigen-Alignments	54
Abb. 10: Neighbour-Joining-Analyse des Multigen-Alignments	55
Abb. 11: Maximum-Likelihood-Analyse des Multigen-Alignments	56
Abb. 12: Bayessche Analyse des Multigen-Alignments	57
Abb. 13: Neighbour-Joining-Analyse des ITS-Alignments	61
Abb. 14: Maximum-Likelihood-Analyse des ITS-Alignments	62
Abb. 15: Bayessche Analyse des ITS-Alignments	63
Abb. 16: Neighbour-Joining-Analyse des LSU-Alignments	65
Abb. 17: Maximum-Likelihood-Analyse des LSU-Alignments	66
Abb. 18: Bayessche Analyse des LSU-Alignments	67
Abb. 19: Maximum-Parsimony-Analyse des TEF1-Alignments	69
Abb. 20: Neighbour-Joining-Analyse des TEF1-Alignments	70
Abb. 21: Maximum-Likelihood-Analyse des TEF1-Alignments	71
Abb. 22: Bayessche Analyse des TEF1-Alignments	72
Abb. 23: Phylogenie Hypothese für die Gattung Urocystis	82

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verteilung der Brandpilze (mit den Microbotryales) zu ihren Wirtsfamilien	11
Tab. 2: Verteilung der europäischen Urocystis-Arten auf die Wirtsfamilien	15
Tab. 3: Auflösungsvermögen verschiedener Gen-Marker der rRNA bei phylogenetischen Rekonstruktionen	19
Tab. 4: von GenBank genutzte Sequenzen	22
Tab. 5: Übersicht der Arbeitsschritte der einzelnen Aufsammlungen	24
Tab. 6: verwendete Oligonukleotide	34
Tab. 7: PCR-Master-Mix	38
Tab. 8: verwendete Oligonukleotide und PCR-Programme	39
Tab. 9: anhand der morphologischen Daten entwickelten Sporenkategorien	73
Tab. 10: Zuordnung der Urocystis-Arten in die Sporenkategorien	74

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BS	Bootstrap
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EtBr	Ethidiumbromid
H ₂ O _{reinst}	Reinstwasser
ITS	Internal Transcribed Spacer
kb	Kilobasenpaare
LSU	Large Subunit = große (ribosomale) Untereinheit
ML	Maximum Likelihood
MP	Maximum Parsimony
mt	mitochondrial
mtDNA	mitochondriale DNA
n.S.	nächste Seite
NJ	Neighbour-Joining
ORF	offenes Leseraster (<i>Open Reading Frame</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pp	posterior probabilities
rDNA	ribosomale DNA
SSU	Small Subunit = kleine (ribosomale) Untereinheit
Tab	Tabelle
tm	Schmelztemperatur
u.a.	und andere
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Systematik der Gattung *Urocystis*

Die Gattung *Urocystis* RABENHORST gehört zu den Brandpilzen und wird zu den Ustilaginomycotina gruppiert und soll hier in ihrem systematischen Hintergrund dargestellt werden.

1.1.1 Allgemeines zu Pilzen

Kendrick (Kendrick 2000) definiert die Pilze als „eukariotische, heterotrophe, absorbierende Organismen, welche einen eher diffusen, verzweigten und tubulären Körper ausbilden und sich mit Hilfe von Sporen ausbreiten.“ Baldauf und Palmer (1993) zeigten mittels molekularphylogenetischer Methoden das die Pilze, welche traditionell den Pflanzen zugerechnet wurden, mehr mit den Tieren als mit den Pflanzen verwandt sind. In der für diese Arbeit errechneten Multigen-Analyse wurde die Verwandtschaft der Chitinpilze und Tiere als monophyletische Gruppe unterstützt. Schätzungen zufolge gibt es zwischen 712.000 (Schmit & Mueller 2007) und 1,5 Millionen Pilze (Hawksworth 2001), von diesen wurden bisher erst zwischen 80.000 und 120.000 beschrieben (Ainsworth & Kirk 2008; Webster & Weber 2008). Bei der aktuellen Rate von 1.000 bis 1.200 Arten pro Jahr, mit der z.Z. neue Pilze beschrieben werden, würde es noch über tausend Jahre dauern, bis die restlichen Arten beschrieben wären (Hawksworth 2001). Ein großer Teil der beschriebenen Pilzarten gehört zu den Basidiomycota und Ascomycota, welche als Dikarya zusammengefasst werden. Diese werden durch molekularphylogenetischen Analysen als Schwesterngruppen unterstützt (Bruns u.a. 1992). Die Ascomycota, charakterisiert durch die Asci, stellen mit etwa 61.000 Arten (Ainsworth & Kirk 2008) das größte Phylum innerhalb des Pilzreiches dar (James u.a. 2006).

1.1.2 Basidiomyceten

Mit ca. 31500 beschriebenen Arten sind die Basidiomyceten das zweitgrößte Phylum innerhalb der Pilze (Ainsworth & Kirk 2008). Zu den Basidiomyceten gehören Pilze mit

unterschiedlicher Ökologie, von Symbionten wie Flechten, Mykorrhiza, saprobe Pilze wie Holzabbauer bis zu Tier- und Pflanzenparasiten.

Ainsworth und Kirk (2008) definieren die Basidiomyceten wie folgt: Das Erkennungsmerkmal der Basidiomyceten ist die Basidie, welche die Basidiosporen trägt. Dabei ist die typische Basidie unseptiert und hat vier einzellige, haploide Basidiosporen. Die Basidie kann allerdings sowohl horizontal wie auch vertikal septiert sein, und auch mehr oder weniger Sporen tragen. Weiteres charakteristisches Merkmal sind die Schnallen an den Septen. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen Septen mit Doliporen, eine doppelschichtige Wand und elektronendichte, dunkle Bereiche. Die meisten Basidiomyceten sind Hyphenpilze, können jedoch auch als hefeähnliche Stadien, sogenannte dimorphe Pilze auftreten (Ainsworth & Kirk 2008). In der Basidie finden in unmittelbarer Folge die Karyogamie und Meiose statt, bevor die meist vier haploiden Kerne in die stielförmigen Auswüchse der Basidie wandern, wo die eigentliche Basidiosporenbildung stattfindet (Strasburger & Bresinsky 2008).

Folgende drei Subphyla werden für die Basidiomycota anerkannt: Agariomycotinia, Pucciniomycotina und Ustilaginomycotina (Ainsworth & Kirk 2008). Die Brandpilze, welche nach ihrem typischen „verbrannten“ Befallsbild benannt werden, stellen, nach den Pucciniomycotina, die zweitgrößte Gruppe pflanzenpathogener Basidiomyceten dar. Dabei ist das Erscheinungsbild „Brandpilz“ zweimal unabhängig voneinander evolviert, es wird auch vom Brandpilzsyndrom gesprochen (Bauer, Begerow & Oberwinkler 1998). Es gibt einmal die relativ kleine Gruppe der Microbotryales, welche zur Unterabteilung der Pucciniomycotina, die größtenteils Rostpilze beherbergt, eingeordnet wird (Begerow, Bauer & Oberwinkler 1997). Zum anderen gibt es diejenigen, die größtenteils die Ustilaginomycotina – die sogenannten „echten Brandpilze“ – ausmachen (Begerow, Stoll & Bauer 2006).

1.1.3 Ustilaginomycotina

Das Brandpilzsyndrom macht ein „Definitionsproblem“ deutlich. So werden die Brandpilze in der klassischen Definition lediglich als „pflanzenparasitierende Mikropilze welche zu den Basidiomyceten gehören“ beschrieben (Vánky 2002). Die aktuelle Definition bedient sich neben den klassischen Merkmalen, wie z.B. der Morphologie, auch ultrastruktureller, chemischer und molekularer Merkmale, nach denen zu den Ustilagi-

nomycota pflanzenparasitische Pilze gehören, welche nicht zwangsläufig Teliosporen ausbilden müssen, sowie saprophytische und humanpathogene Pilze (Vánky 2002; Begerow 2006).

Einige überraschende Resultate der neueren, komplexen Phylogenie sind neben der neuen Stellung der Microbotryales auch die Tatsache, dass neben den typischen Brandpilzen auch Pflanzenparasiten ohne Teliosporen, wie z. B. Vertreter Microstomatales und Exobasidiales, in dieser Gruppe vorhanden sind (Begerow, Bauer & Oberwinkler 1997). Weiter zeigte sich, dass einfache Sporenballen als Adaptation der parasitischen Lebensweise auf Wasserpflanzen (Dossansiopsaceae, Dossansiaceae) evolvierten, und dass das Vorhandensein, bzw. Fehlen, von Sporenballen nicht immer den Verwandtschaftsgrad widerspiegelt (Vánky 2002).

Die Ustilaginomycotina, von denen etwa 1500 Arten (Vánky 2002) bekannt sind, parasitieren fast ausschließlich krautige Pflanzen. Mehr als 800 (~ 50%) davon parasitieren auf Poaceen, viele auf anderen Wirtsfamilien. Bei den Scrophulariaceen ist erst ein Brand, *Urocystis schizocaulon*, bekannt (Tab. 1).

Tab. 1: Verteilung der Brandpilze (mit den Microbotryales) zu ihren Wirtsfamilien, nach (Vánky 2002)

Wirtsfamilie	Arten	Brände	% total	Verhältnis Wirt/Parasit
Graminaceae	9000	800	55,2	11/1
Cyperaceae	4000	220	15,2	18/1
Compositae	25000	108	7,4	231/1
Polygonaceae	800	50	3,4	16/1
Ranunculaceae	2000	50	3,4	40/1
Liliaceae	3500	32	2,2	109/1
Leguminoseae	17000	21	1,4	809/1
Juncaceae	400	18	1,2	22/1
Umbelliferae	3000	18	1,17	166/1
Caryophyllaceae	2000	17	1,17	117/1
Alismataceae	100	16	1,1	6/1

Scrophulariaceae	3000	15	1	200/1
------------------	------	----	---	-------

Die Unterabteilung Ustilaginomycotina umfasst die beiden Klassen Ustilaginomycetes und Exobasidiomycetes (Hibbett u.a. 2007), von denen im Folgenden auf die Ustilaginomycetes eingegangen werden soll.

Der Entwicklungszyklus der Ustilaginomyceten ist gewöhnlich dimorph und durch eine saprophytische haploide Phase und einer phytoparasitischen, dikaryotischen Phase (Abb. 1) gekennzeichnet. Die haploide Phase, welche der Verbreitung und Vermehrung durch Sprossung dient, beginnt gewöhnlich mit der Bildung von Basidiosporen nach der Meiose. Sie endet mit der Konjugation von kompatiblen haploiden Zellen,

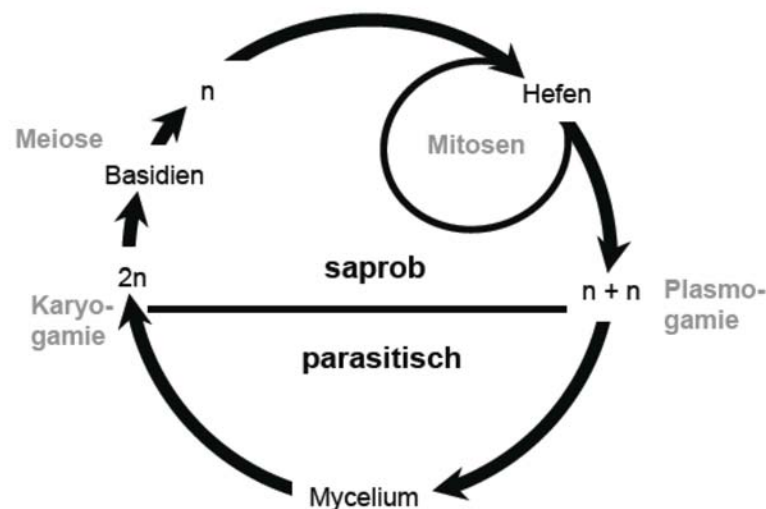


Abb. 1: generalisierter Lebenszyklus der Brandpilze (Kemler, Begerow & Lutz 2006)

die zu einem dikaryotischen, parasitären Hyphen auswachsen. Die dikaryotische Phase endet mit der Bildung der Teliosporen. Fast alle Ustilaginomyceten sporulieren auf oder im parenchymatischen Gewebe ihrer Wirtspflanzen. Bei der jungen Basidie verdickt sich zuerst die Zellwand und anschließend trennt sich die Teliospore mit der Reife vom Sorus ab. Die Teliospore ist in der Regel die auffälligste Stufe im Lebenszyklus der „echten Brände“ (Bauer & Oberwinkler 2008).

Während der parasitischen Phase interagieren die Ustilaginomyceten mit ihren Wirten über spezielle Interaktionszonen. Dabei weisen Hyphen der Ustilaginomyceten, welche

im Kontakt mit Wirtszellen sind, an den flächigen Interaktionszonen Ablagerungen auf. Dieser elektronendichte Inhalt wird, nach dem Transport durch interaktive Vesikeln, auf der Wirtsseite akkumuliert. Die Funktion des Transfers dieses Inhaltes ist bisher noch nicht bekannt. Eine Hypothese könnte sein das dem transferierten Material eine stabilisierende Wirkung zu kommt (Bauer & Oberwinkler 2008).

1.1.4 Urocystales

Die Urocystales, die zweite der beiden Ordnungen neben den Ustilaginales, innerhalb der Ustilaginomycetes (Hibbett u.a. 2007), lassen sich wie folgt charakterisieren: Interaktive Vesikeln, flächige Interaktionszonen, Septenporen mit Membranverschlüssen, Haustorien die regulär in den Wirtszellen enden, mehrheitliches Auftreten der Sori an vegetativen Wirtsteilen, in Ballen arrangierte Brandsporen und parasitieren von überwiegend zweikeimblättrigen Pflanzen (Bauer, Begerow & Oberwinkler 1998). Innerhalb der Urocystales stellt die Gattung *Antherospora* die Schwestergruppe zu den anderen Gattungen der Urocystaceae.

1.1.5 Urocystaceae

Die Urocystaceae stellen eine morphologisch diverse Gruppe mit pigmentierten Teliosporen dar, wovon die meisten ihre Sporen in Ballen entwickeln. Des weiteren sind Homo- und Phragmobasidien bekannt und es herrscht ein breites Wirtsspektrum, vorwiegend krautige Pflanzen, vor (Begerow, Stoll & Bauer 2006). Folgende Gattungen beherbergen die Urocystaceae: *Flamingomyces*, *Melanustilospora*, *Mundkurella*, *Urocystis*, *Ustacystis* und *Vankya* (Bauer u.a. 2008). In einer anderen Arbeit aus demselben Jahr (Vánky, Lutz & Bauer 2008) werden die Glomosporiaceae als Schwestergruppe zu den Urocystaceae gehandelt.

Bei *Flamingomyces* handelt es sich um eine Brandpilzgattung, die Wasserpflanzen parasitiert und einfache Sporen aufweist (Piepenbring, Bauer & Oberwinkler 1998). Die Gattung *Mundkurella* kommt ausschließlich auf den Araliaceen vor und besitzt, je nach Art, entweder einfache Sporen oder aber bis zu vierzellige Sporen (Vánky 1990). *Ustacystis* ist eine monotypische Gattung, die auf Rosaceen parasitiert und ebenfalls Sporen-

ballen aufweist (Piepenbring, Bauer & Oberwinkler 1998). Die Gattung *Vankya* kommt nur auf Liliaceen vor und besitzt Einzelsporen (Bacigálová u.a. 2005). Eine weitere Gattung ist *Melanoxa*, die auf *Oxalis* parasitiert und einfache Sporen aufweist (persönliche Kommunikation Lutz & Bergerow). Die Gattung *Urocystis* wird nachfolgend genauer beschrieben.

1.1.6 *Urocystis*

Die Brandpilzgattung *Urocystis* RABENHORST scheint eine morphologisch gut abgegrenzte Gattung zu sein und umfasst ca. 140 Arten (Vánky 1994). Der Genus wurde erstmals 1922 von Liro wissenschaftlich korrekt als *Tuburcinia* beschrieben. Der Typusbeleg *Urocystis occulta* (WALLROTH) RABENHORST ex FÜCKEL wurde bis 1870 unter verschieden „nomen nudum“ beschrieben, wovon der Erste 1833 als *Erysibe occulta* WALLROTH *α secales* WALLROTH war.

Urocystis parasitiert auf verschiedenen Wirtspflanzenfamilien, die sowohl zu den Mono- als auch den Dikotyledonen gehören. Die Sori werden, abhängig von der jeweiligen Art, in verschieden Teilen, meist jedoch in Blättern oder Stängeln – seltener im Wurzel- oder Blütenbereich, der Wirtspflanzen gebildet. Diese sind zunächst bleigrau und von der Epidermis bedeckt, reißen später aber als Brandstreifen oder –pusteln auf. Dadurch wird die meist pulverige Sporenmasse freigesetzt (Scholz & Scholz 1988). Unter den Wirtspflanzen sind auch einige Arten von wirtschaftlichem Interesse. So verursacht *Urocystis agropyri* (Flag Smut) auf Weizen Ernteaufälle von 40-60% in einigen indischen Bundesstaaten (Bhatnagar u.a., 1978; Karwasra, Beniwal & Chhabra 2008). In Australien wurde von Ausfällen bis 90% berichtet, in Japan kamen sogar Komplettaufälle der Ernte vor (Purdy 1965). Auch wirtschaftliche Einbußen durch andere *Urocystis*-Arten, z. B. durch *Urocystis gladiolica* bei Gladiolen (Schenk 1958) oder durch *Urocystis cepalae* bei Zwiebeln (Whitehead 1921) sind bekannt.

Die in Europa beheimateten 78 *Urocystis*-Arten verteilen sich auf 14 Wirtsfamilien. Davon befallen 26 Arten Ranunculaceen und 15 Arten Poaceen (Vánky 1994)(s. Tabelle 2).

Tab. 2: Verteilung der europäischen *Urocystis*-Arten auf die Wirtsfamilien

Wirtsfamilie	Anzahl <i>Urocystis</i> -Arten	%
Amaryllidaceae	3	3,8
Brassicaceae	2	2,6
Cyperaceae	2	2,6
Iridaceae	1	1,3
Juncaceae	5	6,4
Liliaceae	12	15,4
Orobanchaceae	1	1,3
Poaceae	15	19,2
Primulaceae	5	6,4
Ranunculaceae	26	33,3
Rosaceae	2	2,6
Saxifragaceae	1	1,3
Scrophulariaceae	1	1,3
Violaceae	2	2,6
Gesamt	78	100,0

Die Sporen sind in Sporenballen vereint. Die fertilen Sporen, meist ein bis drei, selten bis zu 60 bei *Urocystis trientalis*, bilden das Zentrum des Ballens und sind von dunkler Färbung. Sie werden von helleren, häufig kugeligen, sterilen Zellen umgeben. Die Morphologie der Sporenballen ist zwischen den verschiedenen Arten variabel. Die Keimung ist vom *Tilletia*-Typ (Scholz & Scholz 1988).

1.2 Molekularphylogenetische Marker

Bei der phylogenetischen Rekonstruktion auf der Grundlage von molekularen Markern stehen verschiedene Gen-Regionen zur Verfügung. Diese sind je nach Fragestellung verschieden gut geeignet und können bei den Pilzen sowohl im Kerngenom als auch im mitochondrialen Genom gefunden werden (Strasburger & Bresinsky 2008). Das haploide Kerngenom ist bei den Pilzen in etwa zwischen 10^7 und 10^9 Basenpaaren (bp) groß (Storch, Welsch & Wink 2007). Bei dem Mitochondriengenom liegt die Größe zwischen 18.000 und 180.000 bp (Strasburger & Bresinsky 2008). Außer in ihrer Größe unterscheiden sich die beiden Genome in ihren Vererbungsmustern sowie ihrem quantitativen Auftreten. Die mtDNA kommt mit bis zu 6.500 Kopien pro Zelle vor (Strasburger & Bresinsky 2008) und wird fast ausschließlich maternal vererbt. Das Kerngenom liegt dagegen nur einmal pro Zelle im Zellkern vor und wird nach den mendelschen Regeln vererbt.

Die am häufigsten genutzten genetischen Marker bei den Pilzen sind zur Zeit: die ITS (Internal Transcribed Spacer)-, SSU (Small Subunit)- und LSU (Large Subunit)- rDNA-Regionen, von denen Ende 2009 etwa 147.000, 137.000 bzw. 115.000 Sequenzen bei GenBank hinterlegt waren (Begerow u.a. 2010).

Ein Unterscheidungsmerkmal bei den Markern ist, ob diese Protein-codierend sind oder nicht. Protein-codierende Regionen weisen wesentlich seltener Deletionen, Insertionen oder Inversionen auf (Storch, Welsch & Wink 2007) und sind somit konservierter. Sie unterliegen weiter wesentlich stärker dem Selektionsdruck als nicht-codierende DNA, wobei aufgrund des redundanten genetischen Codes die Selektion an der dritten Codonposition eines Triplets geringer ist als an den anderen beiden Positionen. Bei rDNA-Genen handelt es sich um ribosomale Gene, die im Kerngenom und im mitochondrialen Genom vorkommen, aber nicht für Proteine codieren. Die rDNA codiert für die rRNA, einen wichtigen Bestandteil der Ribosomen. Durch diese Eigenschaften eignen sich Sequenzen von Protein-codierenden Genen zur Rekonstruktion höherer phylogenetischer Beziehungen (Lutzoni u.a. 2004). Weiter eignen sie sich zur Rekonstruktion von Linien, welche mit rDNA nicht gut aufgelöst werden können (Liu & Hall 2004).

Neben diesen drei Marker-Genen werden noch einige andere Gene genutzt, wie z. B. ATP6, TEF1, β -TUB, COX3, IGS, RPB1, RPB2 oder LBA die im Folgenden vorgestellt werden sollen. Diese Regionen finden, jedenfalls bisher, eine nicht so breite Anwendung wie die vorhergenannten.

1.2.1 Marker des Kerngenoms

1.2.1.1 β -Tubulin

β -Tubulin ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 50kDa und bildet zusammen mit α -Tubulin Dimere aus, aus denen die Mikrotubuli aufgebaut werden (Knippers 2001). Es findet sich bei allen Eukaryota und ist gut für Phylogenien auf höherer Ebene geeignet (Einax & Voigt 2003) und bereits erfolgreich für eine Phylogenie der Basidiomycota angewandt wurde (Begerow, John & Oberwinkler 2004).

1.2.1.2 left border a locus (*lba*)

Die *lba*-Genregion (left border a locus) ist ein konserviertes Leseraster (ORF), welches den *a*-Locus, einen mating-type Locus, auf der linken Seite flankiert und für ein Protein unbekannter Funktion codiert. Der *a*-Locus, welche u.a. von Schirawski u.a. (2005) untersucht wurde, existiert in zwei Allelen und codiert für ein Pheromon/Rezeptor-System. LBA1 von *Sporisorium reilianum* zeigte in deren Arbeit eine 86,1%ige Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz zum korrespondierenden LBA1-Protein von *Ustilago maydis*. Eine Anwendung als phylogenetischer Marker ist, zumindest bei Pilzen, bisher nicht bekannt.

1.2.1.3 RPB1 und RPB1

RPB1 und RPB2 codieren Untereinheiten der Kern-RNA-Polymerase. Da dieses Gene eine funktionelle Rolle in der Transkription aller mRNA-codierender Gene des Kernes spielen, ist ihre Evolution stark eingeschränkt und entsprechend langsam (Liu, Hodson & Hall 2006).

1.2.1.4 Translation elongation Factor 1- α (Tef1)

Tef1 ist ein hoch konserviertes Gen des Kerngenoms, welches für den „translation elongation factor 1- α (EF-1 α)“ codiert. Dieser spielt eine wichtige Rolle im Elongations-schritt der Proteinsynthese. EF-1 α bindet Amino-acylierte tRNA's im Cytoplasma und

positioniert diese an der A-Bindestelle des Ribosoms und kontrolliert die Rate und Genauigkeit der Proteinsynthese (Baldauf 1999).

Die TEF1-Sequenzen bei Basidiomyceten lassen sich über große phylogenetische Distanzen leicht alignieren. Sie sind bei den Introns sehr variabel und es scheint, dass die Intron-Positionen häufig abstammungsspezifisch auftreten (Brandon Matheny u.a. 2007).

1.2.2 Marker der ribosomalen DNA (rRNA)

Ribosomale DNA (rDNA), die Bestandteil des Kerngenoms ist, findet eine breite Anwendung für die Identifikation von Mikroorganismen. Die (Pilz-)rDNA kommt in tandemartigen Einheiten vor, wobei jede Einheit für die 18S (SSU, small subunit), 5.8S, 26S (LSU, large subunit) und 5S rRNA-Gene codiert. In jeder dieser Einheiten existieren zwei Spacer-Regionen, die ITS (Internal Transcribed Spacer) zwischen der SSU und LSU sowie die IGS (Inter Genetic Spacer) zwischen LSU und SSU (Abb.: 2).



Abb. 2: Schema einer rRNA-Einheit Für SSU, ITS, LSU, IGS. Der schwarze Balken zeigt die am häufigsten genutzten Bereiche. Entnommen aus (Begerow u.a. 2010)

Die vier Untereinheiten weisen relativ konstante Größen auf, mit etwa 1800bp für die SSU, 160bp für die 5.8S, 3500bp für die LSU und 120bp für die 5S (Boekhout u.a. 2010). Die Nutzung der verschiedenen Regionen ist abhängig von der jeweiligen Fragestellung. Während die IGS eine Auflösung bis zur Stammebene ermöglicht, eignet sich die ITS vor allem für Untersuchungen auf Art-Ebene. D1/D2 und SSU hingegen sind teilweise bis Klassen-Ebene geeignet (Boekhout u.a. 2010).

Tab. 3: Auflösungsvermögen verschiedener Gen-Marker der rRNA bei phylogenetischen Rekonstruktionen, nach (Boekhout u.a. 2010)

Region	Klasse	Familie	Gattung	Art	Stamm
SSU	x	x	x	x	
D1/D2	x	x	x	x	
ITS			(x)	x	
IGS				x	x

1.2.2.1 Inter Genetic Spacer (IGS)

Die IGS-Region, welche keine bekannte codierende Funktion aufweist, ist die am schnellsten evolvierende Region der rDNA und variiert bereits häufig zwischen Populationen, Individuen oder sogar Zellen (Gorokhova u.a. 2002). Aufgrund dessen eignet sie sich für die Untersuchung der geographischen Verteilung von Populationen.

1.2.2.2 Internal Transcribed Spacer (ITS)

Die ITS-Region findet bei Pilzen eine breite Anwendung als Markergen (White u.a. 1990). Sie ist eine der am meisten sequenzierten DNA-Marker, welche routinemäßig für Fragen zur Systematik, Phylogenie sowie der Identifikation von Spezies und Stämmen auf Artebene und darunter verwendet wird (Begerow u.a. 2010). Sie enthält zwei variable, nicht codierende Bereiche, die, unterbrochen durch die 5.8S-Region, zwischen der SSU- und der LSU-Region liegen. Vorteil dieser Region ist ihre Größe von 600-800 bp, weswegen sie komplett amplifiziert werden kann. Weiter liegt sie als vielfache Kopie vor, so dass eine Amplifikation mit kleinen, verdünnten und / oder degradierten DNA-Isolationen möglich ist. Ein weiterer Vorteil ist die ausreichende Variabilität der Region, wobei die intraspezifische Variation gering ist (M. Gardes & T. D. Bruns 1993).

1.2.2.3 Large sub-unit (LSU) – D1/D2-Region

Die LSU ist in mehrere hochkonservierte Bereiche, die durch unterschiedliche, divergente Domänen (D-Domäne) unterbrochen wird, organisiert. Diese divergenten Domänen evolvieren relativ schnell, mit Substitutionsraten, die bis zu zweimal höher liegen als die der konservierten Bereiche. Sie wurden bisher bei allen untersuchten Eukaryoten entdeckt (Melen u.a. 1999). Dabei ist die D1/D2-Region der variabelste Abschnitt innerhalb der LSU (Boekhout u.a. 2010). Dieser Abschnitt, meist zusätzlich mit der D3-Region, wurde schon häufiger bei phylogenetischen Untersuchungen, auch für die Brandpilze allgemein (Begerow, Bauer & Oberwinkler 1997), verwendet.

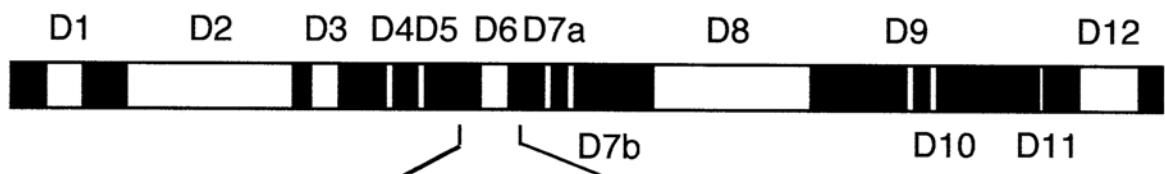


Abb. 3: systematische Darstellung der LSU-rDNA, nach (Melen u.a. 1999)

1.2.3 Marker der mitochondrialen DNA (mtDNA)

Das mitochondriale Genom ist in verschiedenen Organismen unterschiedlich organisiert. Neben der mtLSU und mtSSU haben sich vor allem ATP6 und COX3 für phylogenetische Fragestellungen bei den Pilzen etabliert.

1.2.3.1 ATP6:

Bei *atp6* handelt es sich um ein mitochondrial-codierendes Gen für die sechste Unter-einheit der ATP-Synthase. Die H⁺-ATP-Synthase ist ein extrem komplexes membrangebundenes Enzym, welches das meiste in aeroben Zellen vorhandene ATP produziert (Vinogradov 1999). Aufgrund bereits vorhandener Sequenzen aus vorhergegangenen Arbeiten sind keine langen Introns in diesem Gen-Abschnitt zu erwarten (Kretzer & Bruns 1999). ATP6 wurde genutzt, um die phylogenetischen Verhältnisse bei den Boletales, die zu den Basidiomyceten gehören, aufzuklären (Kretzer & Bruns 1999), wo vor allem die basalen Äste von Interesse waren. Die Ergebnisse zeigten das *atp6* jedoch nicht für höhere taxonomische Level geeignet scheint (Kretzer & Bruns 1999). Eine

Phylogenie für *Sparassis*, ebenfalls Basidiomycota, die mit ATP6 und RPB2 erstellt wurde, zeigte eine Deckung für die höheren Topologien mit denen die aus Kerngenom-Sequenzen gewonnen wurden (Dai u.a. 2006). Die Eignung als phylogenetischer Marker für Basidiomyceten wurde 2003 erfolgreich nachgewiesen (Schartmann 2003).

1.2.3.2 COX3

Cox3 ist ein Gen der mtDNA, das für die Cytochrom Oxidase Untereinheit 3 codiert (Kretzer & Bruns 1999) und eine Länge von ungefähr 800bp aufweist (Tambor u.a. 2006). Arbeiten von Kretzer (1999) zeigen, das COX3 nicht für höhere taxonomische Level geeignet sind, aber wohl Ergebnisse innerhalb einer Pilz-Taxonomie liefern kann.

1.3 Ziele der Arbeit

Das wesentliche Ziel der vorliegenden Arbeit ist die phylogenetische Rekonstruktion der Gattung *Urocystis*. Zum Erreichen dieses Zieles wurde zum größten Teil auf molekularphylogenetische Methoden, aber auch auf morphologische Merkmale zurückgegriffen. Bei den morphologischen Merkmalen war der Focus darauf gerichtet, ob diese die Ergebnisse aus der molekularphylogenetischen Untersuchung stützen. Auch wurde untersucht, ob die morphologischen Merkmale eventuell evolutionären Trends unterworfen sind.

Es wurde eine Multigen-Analyse durchgeführt, die zum einen bereits vielfach genutzte Marker-Gene wie ITS oder LSU enthielt, zum anderen auch Gen-Marker, die noch nicht so häufig Verwendung finden wie TEF1 und ATP6. Die Berechnung für die phylogenetische Rekonstruktion wurde dabei mit den zurzeit üblichen Methoden Neighbour-Joining, Maximum-Likelihood und Bayesscher Statistik durchgeführt.

Weiter stellte sich die Frage, ob sich eine Korrelation im Wirt-Parasit-Gefüge erkennen lässt, also ob es Anzeichen dafür gibt, dass Wirt und Parasit gemeinsam evolvieren, oder ob die Verbindung zufällig ist.

2 Material

2.1 Materialien:

2.1.1 Sequenzen von GenBank

Tab. 4: von GenBank genutzte Sequenzen

Spezies	GenBank Accession-Nr.:		
	ITS	LSU	TEF1
<i>Antherospora vindobonensis</i>	EF653994	EF653976	---
<i>Antherospora scillae</i>	EF653996	EF653978	---
<i>Antherospora vaillantii</i>		EF653979	---
<i>Flamingomyces ruppieae</i>	EF635909	DQ185436	---
<i>Melanustilospora ari</i>	EF635904	EF517924	---
<i>Mundkurella kalopanacis</i>	DQ875351	AF009869	---
<i>Ustacystis waldsteiniae</i>	DQ875356	AF009880	---
<i>Vankya heufleri</i>	EF667965	EF653981	---
<i>Vankya ornithogali</i>	EF635910	EF210712	---

2.1.2 Untersuchungsmaterial:

Ein Teil der DNA-Isolation (TAB. 5) wurden von Prof. Dr. D. Begerow zur Verfügung gestellt, teils mit den dazugehörigen LSU-Sequenzen. Von Dr. M. Lutz wurden ITS- und LSU-Sequenzen der Gattung *Melanoxa* zu Verfügung gestellt. Die Proben aus denen die DNA innerhalb dieser Arbeit isoliert wurden stammten von:

Staatliches Museum für Naturkunde Görlitz (GLM)

Privates Herbarium Dr. Martin Kemler (M.K.)

Herbarium Ustilaginales Vánky (HUV)

Frischen Aufsammlungen aus Exkursionen an den Niederrhein und in die Alpen

Bei der DNA-Isolation wurde in erster Linie auf Belege zurückgegriffen, die keine Zweitinfektion aufwiesen. Die Isolationsnummern setzen sich aus der Herkunftsbezeichnung sowie der Herbarnummer zusammen.

Tab. 5: Übersicht der Arbeitsschritte der einzelnen Aufsammlungen

erfolgreich	D = Isolationen D. Begerow	AS = Sammlung A. Schäfer
zweifelhaft	G = Staatliches Museum für Naturkunde Görlitz (GLM)	ML = Sammlung M. Lutz
erfolglos	HMK = Herbarium M. Kemler	SLE = Sammlung S. Lotze-Engelhard
falsches Sequenzierergebnis	HUV = Herbarium Ustilaginales Vánky	SEQ = Sequenz

Spezies	Herkunft	Herbar-Nr.	ITS PCR	ITS-Seq	Isu PCR	Isu Seq	tef1 PCR	tef Seq	MultiGen
Antherospora vaillantii	D	3500		x		x	x	x	
Antherospora vaillantii	D	3505	x	x		x	x	x	x
Antherospora vaillantii	D	3506	x	x		x	x	x	
Melanoxa sp.	D	1969	x				x		
Melanoxa sp.	D	1729	x						
Melanoxa sp.	ML	ML 1306		x		x			x
Melanustilospora	HK	MK41X	x		x	x			
Melanustilospora ari	D	1157	x	x	x	x	x	x	x
Urocystis agropyri	G	054517	x	x	x	x	x	x	
Urocystis agropyri	G	47423	x	x	x	x	x	x	x
Urocystis agropyri	G	48081	x						
Urocystis agropyri	G	48082	x						
Urocystis agropyri	G	48104	x						
Urocystis agropyri	G	48105	x						
Urocystis agropyri	G	50405	x						
Urocystis agropyri	G	59383	x						
Urocystis agropyri	G	64724	x	x	x	x	x	x	
Urocystis agropyri	G	64780	x	x	x	x			
Urocystis agropyri	G	64886	x						
Urocystis agropyri	G	64887	x						

Urocystis agropyri	G	65280	X																	
Urocystis alopecuri	MK	MK289	X	Blue		X		X			X				X					X
Urocystis alopecurus	D	5430	X		X			X			X				X					X
Urocystis alopecurus	D	5431	X	Yellow				X			X									
Urocystis alopecurus	G	07201	X			X				Blue										
Urocystis alstroemeria	D	5193	X		X			X			X				X					X
Urocystis anemomes	G	054538	X																	
Urocystis anemomes	G	47058	X	Yellow																
Urocystis anemomes	G	50316	X																	
Urocystis anemomes	G	59421	X		X			X			X				X					X
Urocystis anemomes	G	64734	X	Blue		X			Red											
Urocystis anemomes	G	64735	X																	
Urocystis anemomes	G	64742	X		X			X			Yellow				X					X
Urocystis anemomes	G	64868	X	Yellow																
Urocystis anemomes	G	65283	X		X			X			X				X					X
Urocystis anemomes	G	65284	X	Yellow																
Urocystis anemomes	G	76030	X		X			X			X				X					X
Urocystis anemomes	G	76185	X		X			X			X			Blue	X					X
Urocystis anemomes	MK	HMK303	X		X			X			X				X					X
Urocystis anemomes	D	1845			X						X				X					
Urocystis anemomes	D	1885			X						X				X					
Urocystis auf Gallega	MK	MK20	X																	
Urocystis auf Gramineae	D	3439	X		X						X				X					X
Urocystis auf Poaceae	D	1734	X		X						X				X					X
Sporisorium	MK	MK23	X	Blue																
Urocystis avenastri	D	3577	X		X			X		Red										X
Urocystis beckmannia	D	5432	X		X						X				X					X
Urocystis bolivari	MK	MK299	X		X			X			X				X					X

Urocystis junci	G		17226	X				X				X								X				
Urocystis kmetiana	HUV		HUV15010	X				X																
Urocystis luzulae	G		47378	X	X					X											X			X
Urocystis miyabeana	G		47384	X				X													X			
Urocystis miyabeana	G		54504	X																	X			
Urocystis miyabeana	G		59378	X	X					X											X			X
Urocystis occulta	G		17220	X																				
Urocystis ornithogalli	D		5179	X					X												X			
Urocystis ornithogalli	D		5499	X					X												X			X
Urocystis orobanches	D		5451	X																				
Urocystis poae	MK		HMK80	X	X					X											X			X
Urocystis primulae	D		3511	X	X																X			X
Urocystis primulae	MK		MK22	X																				
Urocystis pulsatile	MK		HMK265	X	X					X											X			X
Urocystis pulsatile	SLE		SLE002	X																	X			X
Urocystis ranunculi	G		49279	X	X					X											X			X
Urocystis ranunculi	G		50352	X																				
Urocystis ranunculi	G		60008	X						X											X			
Urocystis ranunculi-auricomis	G		17262	X																	X			
Urocystis syncocca	D		3596	X	X					X											X			
Urocystis syncocca	G		49254	X																				
Urocystis syncocca	MK		MK05	X	X					X											X			
Urocystis syncocca	MK		MK04	X	X					X											X			X
Urocystis trientalis	G		47383	X	X					X											X			X
Urocystis trientalis	G		49576	X																	X			
Urocystis trillii	D		5493	X	X					X											X			X
Urocystis triseti ???	MK		MK291	X	X					X											X			X
Urocystis ulei	D		3510	X	X					X											X			X

Urocystis violae	HUV	HUV3138	x			x							
Usti.thlaspeos.	D	1729	x	x			x						
Ustilago sp.	MK	MK292	x	x		x							
Vankiya heufleri	D	3395		x			x						x
Vankya ornithogalli	D	1890		x			x					x	x

2.1.3 Verbrauchsmaterialien, Kits und Reagenzien

Abimed GmbH (40764 Langenfeld, Germany):

Pipette DC 10 (0,5-10µl)

Pipette DC 100 (100-100 µl)

Pipette DC 200 (20-200 µl)

Pipette DC 1000 (100-1000 µl)

Analytik Jena AG (07745 Jena, Germany)

innuPREP Plant DNA Kit (250 Präparationen)

Bio-Budget Technologies GmbH (47805 Kreefeld, Germany)

my-Budget Double Pure Kit (250 Präparationen)

dNTP-Set

Brand GmbH & Co KG (97861 Wertheim, Germany)

0,2 ml 8er PCR-Gefäße, farblos

8er PCR-Deckel, farblos, gewölbt

Braun Aesculap AG (78532 Tuttlingen, Germany)

Cutifix Stainless Einmalskalpell #11

CAMPING GAZ (Deutschland) GmbH (35410 Hungen-Inheiden, Germany)

C 206 super (Butan-Kartuschen)

Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, NJ 08865, USA

Borsäure

Menzel GmbH & Co KG (38116 Braunschweig, Germany)

Menzel-Gläser, Objektträger 76x26mm, gebrauchsfertig

Merck (64293 Darmstadt, Germany)

Na₂-EDTA

Paul Marienfeld GmbH & Co KG (97922 Lauda-Königshofen, Germany)

Deckgläser 24x24mm

Pechiney Plastic Packing (Menasha, WI 54952, USA)

Parafilm PM-996, 4in. x 125 ft.

PEQLAB Biotechnologie GMBH (91052 Erlangen, Germany)

peqGOLD Taq-DNA-Polymerase

Rösner-Mautby Meditrade (83088 Kiefersfelden, Germany)

Gentle Skin classic

Nitril 3000

Quiagen GmbH (40724 Hilden, Germany)

DNeasy Plant Mini Kit (50 & 250 Präparationen)

Sarstedt AG&Co (51588 Nümbrecht, Germany)

Pipettenspitze 20 µl, farblos

Pipettenspitze 200 µl, gelb

Pipettenspitze 1000 µl, blau

Röhre 15ml, 120x17mm, PP

Multiply-Pro Gefäß 0,2ml, PP

Reagiergefäß 1,5ml

Reagiergefäß 2,0 ml

Storage Box, 9x9

Vernichtungsbeutel

Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)

Tris-Base ph8

Oligonukleotide, s. Tabelle Oligonukleotide

Zymo Research Corp. (Orange, CA 92867, USA)

DNA Clean & Concentratortm-5 Kit

2.1.4 Geräte:

Apple Inc. (Cupertino, CA 95014, USA)

iMAC (20 Zoll, Modellreihe: Mitte 2007)

BioRad (80939 München, Germany)

PowerPac Basic Power Supply

Mini-Sub Cell GT, including

Mini-Sub Cell GT Combs, 15 Well

Mini-Sub Cell GT Tray, 7x10cm

DNA Engine® Thermal Cycler - PTC-200 DNA Engine Cycler
CAMPING GAZ (Deutschland) GmbH (35410 Hungen-Inheiden, Germany)
Labogaz 206 (Gasbrenner)
Carl Roth GmbH & Co KG (76185 Karlsruhe, Germany)
Mikromörser + Pistill, 8mm
Micro centrifuge IR (6000rpm)
Tischständer (für Vernichtungsbeutel)
Consort (2300 Turnhout, Belgium)
EV243 (Elektrophorese Netzgerät)
Dell (60549 Frankfurt am Main, Germany)
Studio 1747 (Anfang 2010, i7-Core)
XPS 480 Quad-Core
Eppendorf (22339 Hamburg, Germany)
Centrifuge 5424
Thermomixer comfort
BioPhotometer
IKA (79219 Staufen, Germany)
RH basic 2 (Magnetrührer)
Implen (81829 München, Germany)
LG100-UV-G mit Lid Factor 10 LP 1mm
Kern (72336 Balingen-Frommern, Germany)
Kern EMB 1200-1
Präzisionswaage 572
Liebherr Holding GmbH (88400 Biberach an der Riss, Germany)
Kühl-Gefrierkombination Comfort
Gefrierschrank Premium Plus
Memmert (91126 Schwabach, Germany)
UNB500 – Wärmeschrank
Mettler Toledo (35353 Giessen, Germany)
SevenEasy (pH-Meter)

Mitsubishi (40880 Ratingen, Germany)

P93 (Thermodrucker Geldokumentation)

Olympus (20097 Hamburg, Germany)

Forschungsmikroskop BX51

CC-12 - Digitale Farbkamera

Rainbow CCTV (Costa Mesa, CA 92626, USA)

RM92 – Monitor Geldokumentation

Retsch (42781 Haan, Germany)

MM2000 – Schwingmühle

Sharp (20097 Hamburg, Germany)

R939 – Mikrowelle

Scientific Industries (via Carl-Roth-GmbH, 76185 Karlsruhe, Germany)

Vortex Genie 2

Vilber Lourmat (88436 Eberhardzell, Germany)

CN-1000.26MX (Dunkelkammer)

IP-CF01.SD (Gelauswertung)

Werkstatt RUB (44780 Bochum, Germany)

Probenhalter für Retsch MM2000, Platz für 6 Eppendorfgefäße

Gelkammer

Stahlkugeln, rostfrei, 2,5mm

Zeiss (07745 Jena, Germany)

Axiostar Plus (Mikroskop)

2.1.5 Software

Adobe Systems GmbH (80992 München, Deutschland)

Creative Suite 5 Design Standard

Gene Codes Corporation (<http://www.genecodes.com> ; Ann Arbor, MI 48108, USA)

Sequencher 4.8, Mac-Lizenz

Sequencher 4.10 – Demo-Version für PC

Microsoft (<http://www.microsoft.de>; 85716 Unterschleißheim, Germany):

Word 2007

Excel 2007

Olympus (20097 Hamburg, Germany)

Cell[^]F

Sinauer Associates, Inc. Publishers (Sunderland, Massachusetts, USA)

Paup* (<http://paup.csit.fsu.edu/> Swofford 2003)

2.1.6 Software – Freeware

BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html> Hall 1999)

Cygwin 1.7.7 (<http://www.cygwin.com>)

DNA-Baser (<http://www.dnabaser.com>)

FigTree 1.3.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>)

GBlocks (<http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks.html> Talavera & Castresana 2007)

MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/windows.html> Katoh & Toh 2008)

MrBayes 3.2 (<http://mrbayes.scs.fsu.edu>;
<http://molecularevolution.org/software/phylogenetics/mrbayes> Huelsenbeck u.a. 2001)

MEGA4 (<http://www.megasoftware.net> Tamura u.a. 2007)

MrModeltest 2.3 (<http://www.abc.se/~nylander/mrmodeltest2/mrmodeltest2.html> Nylander 2004)

Notepad++ (<http://notepad-plus-plus.org>)

RaxML GUI 0.9.b2 (<http://sourceforge.net/projects/raxmlgui> Silvestro & Michalak 2010)

RaxML 7.2.6 (<http://www.kramer.in.tum.de/exelixis/software.html> Stamatakis; Stamatakis, Ludwig & Meier 2005)

TreeGraph 2.0.45 (<http://treegraph.bioinfweb.info> Müller & Müller 2004)

TreeView X (<http://darwin.zoology.gla.ac.uk/~rpage/treeviewx>)

2.1.7 Lösungen und Puffer

0,5 M EDTA-Lösung pH 8,0

181,1 g 0,5 M Na₂-EDTA*2H₂O

mit 1000 ml H₂O_{bidest} ansetzen und den pH-Wert mit NaOH auf 8,0 einstellen.
Fünf Minuten bei 121°C autoklavieren.

Agarose-Gel 0,8 / 1,5% (w/v)

3,2 / 6,4g Agarose und

400ml TBE-Puffer (1x)

aufkochen bis Agarose gelöst ist.

dNTPs

my-Budget dNTP-Set:

Je 10µl dATP, dCTP, dGTP, dTTP in 60µl TE-Puffer pH 8,0 (1x) mischen.

Ladepuffer (6x)

50g 50%ige Saccharose und

0,125g 0,1% Bromphenolblau

mit TE-Puffer auf ein Volumen von 100 ml ansetzen und steril filtrieren:

TBE (5x)

54,4g 440 mM Tris-Base pH 8,0 und

27,5g 440 mM Borsäure und

20ml 2% (v/v) 0,5 M EDTA in H₂O_{bid}

mit H₂O_{bidest} auf 1000 ml auffüllen.

TE-Puffer pH 8,0 (1x)

1,2g 10 mM Tris-Base und

0,8g 1 mM Na₂-EDTA*2H₂O

in H₂O ansetzen und pH mit HCL auf 8,0 einstellen. Anschließend 5 min bei 121°C autoklavieren.

Verwendeter DNA-Größenstandard:

1kb Leiter

2.1.8 Oligonukleotide

Tab. 6: verwendete Oligonukleotide

Region	Primer	Sequenz	tm °C	Referenz
ATP	ATP6-5f	WAT RGT WAG AGAWCAAWTAGG	50,2	(Binder & Hibbett 2003)
ATP	ATP6-6r	AACTAATARAGGAACTAAAGCTA	50,0	(Binder & Hibbett 2003)
β-Tubulin	B-tub-1317F	GAGMGRATYAGYGTATTATTAC	44,5	(van der Merwe u.a. 2007)
β-Tubulin	B-tub-2662bR	GAACTCCATCTCGTCCATTCTA	62,0	(van der Merwe u.a. 2007)
β-Tubulin	B-tub-1442F	AGAAYGAGGTYGCTGSCAAC	55,2	(van der Merwe u.a. 2007)
COX3	COX3-1	CATTTAGTATCGCCTTCACCATGGCC	72,0	(Kretzer & Bruns 1999)
COX3	COX3-2	AACAACCAACAACATCTACAAAGTG	63,8	(Kretzer & Bruns 1999)
IGS	LR20R	GTGAGACAGGTTAGTTTTACCCT	59,1	(James u.a. 2001)
IGS	5SA_r	CAGAGTCCTATGGCCGTGGAT	67,3	(Guidot u.a. 1999)
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	68,4	(White u.a. 1990)
ITS	ITS1-F	CTTGTCATTTAGAGGAAGTAA	56,6	(Gardes & Bruns 1993)
ITS	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	61,5	(White u.a. 1990)
ITS	ITS4-B	CAGGAGACTTGACACGGTCCAG	66,9	(Gardes & Bruns 1993)
LBA	ROK355	GAWGAGCTACTACGTTTCAGAC	57,8	diese Arbeit
LBA	ROK354	TCCATAAGATGRGGWCCAGC	60,0	diese Arbeit
LBA	ROK245	GCCGACACMAAMCCTCCYG	65,7	Ronny Kellner, n.V.
LBA	ROK248	GCGTRTAGATRCRAAMGGCTG	63,4	Ronny Kellner, n.V.
LBA	SLE001	CCAGCKACACCTCGGTCRTCRAARATG	67,9	diese Arbeit
LBA	SLE002	AYACYATGACKCACGTCGACCAGGCYC	70,1	diese Arbeit
LSU	LROR	ACCCGCTGAACTTAAGC	57,9	(Rehner & Samuels 1994)
LSU	LR6	CGCCAGTTCTGCTTACC	59,5	(Vilgalys & Hester 1990)
LSU	NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	62,0	(Boekhout, Fell & O'Donnell 1995)
LSU	NL4	GGTCCGTGTTCAAGACGG	59,5	(Boekhout, Fell & O'Donnell 1995)

RPB1	RPB1-Cf	CCNGCDATNTRTTRTCCATRTA	60,0	(Liu, Hodson & Hall 2006)
RPB1	RPB1-Af	GARTGYCCDGGDCAYTTYGG	61,7	(Liu, Hodson & Hall 2006)
RPB2	RPB2-3bF	GGWGGWTAYTTYATYATYAATGG	53,9	(Liu, Whelen & Hall 1999)
RPB2	RPB2-5f	GAYGAYMGWGATCAYTTYGG	52,3	(Liu, Whelen & Hall 1999)
RPB2	RPB2-5R	CCRAARTGATCWCKRTCRTC	52,3	(Liu, Whelen & Hall 1999)
RPB2	RPB2-7cR	CCCATRGCTTGYTTRCCCAT	56,4	(Liu, Whelen & Hall 1999)
tefl	EF1-983F	GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT	60,9	(Binder & Hibbett 2003)
tefl	EF1-1577F	CARGAYGTBTACAAGATYGGTGG	62,8	(Binder & Hibbett 2003)
tefl	EF1-1953R	CCRGCRACRGTRTGTCTCAT	56,8	(Binder & Hibbett 2003)
tefl	EF1-2218R	ATGACACCRCRCRCRCRGTYTG	59,8	(Binder & Hibbett 2003)
tefl	Ef-cf	ATYGCYGCNGGTACYGGYGARTTCGA	71,8	(Binder & Hibbett 2003)
tefl	Ef-df	AAGGAYGGNCARACYCGNGAR CAYGC	69,9	(Binder & Hibbett 2003)
tefl	Ef-gr	GCAATGTGGGCRGTRTGRCARTC	69,4	(Binder & Hibbett 2003)

3 Methoden

3.1 Die molekularbiologischen Methoden:

3.1.1 Die Isolierung genomischer DNA:

Zur Isolierung genomischer DNA aus den Teliosporen wurden diese in 1,5 ml Reaktionsgefäßen über Nacht in 20 µl H_2O_{reinst} gequellt. Die gequollenen Sporen wurden mittels einer Schwingmühle (Retsch) in 3 Zyklen a 2 Minuten, nach Zugabe dreier Stahlkugeln (Werkstatt RUB) in das Reaktionsgefäß, mechanisch zerstört. Anfangs und zwischen den einzelnen Zyklen wurden die Sporen mittels flüssigen Stickstoffs schockgefroren, um das Aufbrechen der Sporen zu unterstützen.

Eine weitere Methode zum Aufbrechen der Sporen war der Einsatz eines Mikromörser (Carl-Roth). Dazu wurden die über Nacht in 20 µl H_2O_{reinst} gequollenen Sporen zu Beginn in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Das erste Mörsern erfolgte mit dem Mikropistill (Carl-Roth) in dem Reaktionsgefäß, in dem die Sporen gequollen waren. Anschließend wurde die Sporen-Wasser-Emulsion für zwei weitere Mörserdurchgänge in den Mikromörser transferiert. Zwischen den einzelnen Mörserschritten wurden die Proben erneut in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Nach dem letzten Mörserdurchgang wurde der Mikrostößel mit 50 µl des Lysepuffers aus dem jeweiligen Isolationskit (inuPREP Plant DNA Kit, Analytik Jena oder DNeasy Plant Mini Kit, Quiagen) gespült und die Lösung im Mikromörser aufgefangen. Anschließend wurde die Lösung in das ursprüngliche Reaktionsgefäß überführt. Der Mikromörser wurde mit dem restlichem Lysepuffer (s. Protokolle Isolationskits) ausgespült und die Lösung im ursprünglichen Reaktionsgefäß aufgefangen.

Die weitere Isolation der DNA erfolgte nach Protokoll der Isolationskits, jedoch mit Erhöhung der Lysezeit auf anderthalb bis zwei Stunden, und bei Reduktion des Volumens an Elutionspuffer auf 50-70 µl.

3.1.2 Design von Oligonukleotiden

Die Oligonukleotide wurden in MEGA4 entworfen und mittels „Primer Design Assistant“ (PDA) (Chen u.a. 2003) auf Dimere, Haarnadelstrukturen und GC-Gehalt überprüft. Damit soll ein Auftreten dieser Strukturen, welche die Oligonukleotide unbrauchbar machen würden, vermieden werden.

3.1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR, welche erstmals 1985 erwähnt wurde (Saiki u.a. 1985), ist eine primervermittelte, enzymatische Amplifikation von DNA-Sequenzen (Chen 2002), mit der es in der Molekularbiologie möglich ist, selbst geringste Mengen an DNA derartig zu vervielfältigen, dass eine weitere molekularbiologische Bearbeitung möglich ist. Der Ablauf der PCR verläuft nach folgendem Schema:

1. Denaturierung: Auftrennen der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge durch Erhitzen auf meist 95°C.
2. Annealing: Anlagern spezifischer Oligonukleotide am 5'- und 3'-Ende des zu amplifizierenden Bereiches der als Einzelstränge vorliegenden DNA.
3. Elongation: Verlängern der angelagerten Oligonukleotide mittels einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase bei Anwesenheit freier Desoxynucleosid-Triphosphate (dNTP's), bis die Polymerase vom Strang abfällt oder die Reaktion durch Temperaturerhöhung unterbrochen wird (Müller 2001).

Dieser Zyklus wird in der Regel 35 mal wiederholt, wobei dem ersten Zyklus ein langer Denaturierungsschritt vorangestellt wird. Dem letzten Zyklus folgt ein langer Elongationsschritt.

Die PCR wurde für die Genregionen *ATP6*, *-TUB*, *COX3*, *IGS*, *ITS*, *LBA*, *LSU*, *RPB1*, *RPB2* und *TEF1* durchgeführt.

Für die DNA-Amplifikation wurde das *peqGOLD Taq*-Polymerase-Kit (PeqLab) verwendet. Dies enthält neben der *Taq*-Polymerase bereits gebrauchsfertige Puffer mit Tris-HCl, (NH₄)₂SO₄, Tween 20 und MgCl₂. Der für die Reaktionen verwendete Mastermix (Tabelle 1) entsprach den Herstellerempfehlungen.

Tab. 7: PCR-Master-Mix

Mastermix für PeqLab-Polymerase	1x+P [μ l]	1x [μ l]
Puffer Y (10x mit 20 mM MgCL ₂)	5	5
ddH ₂ O	30,8	40,8
Enhancer P (optional)	10	---
dNTP's (10 mM)	1	1
Oligonukleotid 1 (10pmol/ μ l)	1	1
Oligonukleotid 2 (10pmol/ μ l)	1	1
Taq-Polymerase (5U/ μ l)	0,2	0,2
DNA-Template	1	1
Endvolumen	50	50

Je nach DNA-Gehalt der DNA-Isolation wurde das verwendete Volumen der DNA-Lösung bis auf 5 μ l heraufgesetzt. Um das Endvolumen von 50 μ l zu halten, wurde das Wasservolumen entsprechend angepasst. Die Konzentration der Oligonukleotide im Master-Mix bezieht sich auf nicht-degenerierte Oligonukleotide. Bei degenerierten Oligonukleotiden wurde die Oligonukleotidkonzentration entsprechend angepasst. Dabei wurden einfach degenerierte Oligonukleotide in einer Konzentration von 20 pmol/ μ l, mehrfach degenerierte in einer Konzentration von 100 pmol/ μ l verwendet.

3.1.4 Nested-PCR:

Bei dieser PCR-Methode handelt es sich im Wesentlichen um eine PCR von einem PCR-Produkt. Hierbei werden zwei oder mehr aufeinanderfolgende Amplifikationen mit verschiedenen Oligonukleotiden durchgeführt, die innerhalb der zuvor amplifizierten Genregion liegen (Abb. 4). Diese Methode wurde angewendet, wenn die DNA-Menge, aufgrund zu geringer Ausgangs-Konzentration für eine normale PCR nicht ausreichte. Dies war vor allem für die Amplifikation der TEF1- und ITS-Region notwen-

dig. Bei der ITS-Region wurde eine einfache Nested-PCR, bei der TEF1-Region eine zweifache nested PCR angewandt.



Abb. 4: Schema der Oligonukleotid-Bindestellen bei einer Nested PCR

Für die Amplifikation der verschiedenen Genregionen wurden folgende Primerpaare unter Verwendung der tabellarisch aufgelisteten Programme verwendet.

Tab. 8: verwendete Oligonukleotide und PCR-Programme

Genregion	Anwendung	Oligonukleotid1 / Oligonukleotid2	PCR-Programm(e) (s. Anhang)
ATP	einfache PCR	ATP-6r / ATP-5f	COX3 ATP-V2 ATP-V3
β -TUB	einfache PCR	β -Tub1442f / β -Tub2662br	β T-13-V1
	nested, Runde 1	β -Tub1317f / β -Tub2662br	β T-13-V1
	nested, Runde 2	β -Tub1442f / β -Tub2662br	β T-13-V1
COX3	einfache PCR	COX3-1 / COX3-2	COX3 COX3-V2
IGS	einfache PCR	LR20r / 5SAr	IGS-LR20 IGS-LR22 IGS-LR23
ITS	einfache PCR	ITS1F / ITS4	ITS1-4 ITS1-4LA

	nested, Runde 1	ITS1F / ITS4B	ITS1-4LA
	nested, Runde 2	ITS1 / ITS4	ITS1-4LA
LBA	einfache PCR	Rok245 / Rok248	ROK245
	einfache PCR	Rok354 / RoK355	ROK255
	einfache PCR	SLE001 / SLE002	SLE001
	einfache PCR	LR0R / LR6	LR0R-LR6
	einfache PCR	NL1 / NL4	NL4
	nested, Runde 1	LR0R / LR6	LR0R-LR6
	nested, Runde 2	NL1 / NL4	NL1
RPB1	einfache PCR	RPB1-cf / RPB2-ac	RPB1 RPB1-V2 RPB1-V3
RPB2	einfache PCR	RPB3-BF / RPB2-5R	RPB2 RPB2-LA RPB2-TOU
	einfache PCR	RPB3-5F / RPB2-7cR	RPB2 RPB2-LA RPB2-TOU
	nested, Runde 1 nested, Runde 2	RPB3-BF / RPB2-5R RPB3-5F / RPB2-7cR	RPB2-TOU RPB2-TOU2
TEF1	einfache PCR	ef1 α -983 / ef1 α -2218R	EF983
	einfache PCR	EFdf / EFgr	EF1A/TOU
	nested, Runde1	ef1 α -983F / ef1 α -2218R	EF1A/TOU
	nested, Runde 2 nested, Runde 3	EF-cf / ef1 α -1953 EF-df / EFgr	EF1A/TOU EF1A/TOU

3.1.5 Agarosegel-Elektrophorese

Die Gel-Elektrophorese mit Agarosegelen stellt eine einfache und effektive Methode dar, um DNA-Fragmente zwischen 0,5 und 25kb zu trennen (Mülhardt 2009). Da die DNA durch die Phosphatgruppen in ihrem Grundgerüst negativ geladen ist, bewegt sie

sich in einem elektrischen Feld in Richtung der Anode. Da größere DNA-Fragmente proportional mehr negative Ladungen aufweisen, bewegen sich die DNA-Fragmente in freier Lösung zur Anode mit gleicher Geschwindigkeit. Damit die Fragmente ihrer Größe nach getrennt werden können, werden die Proben in einem Agarosegel aufgetragen. Durch dessen quer vernetzten Polymerketten wirkt es wie ein engmaschiges Netz. In dem Gel nimmt die Laufgeschwindigkeit der DNA-Fragmente mit zunehmender Größe ab (Clark, Held & Held 2006). Diese Fragmente können im Anschluss, nach entsprechender Färbung, mittels eines Geldokumentationssystems identifiziert oder, wenn zur weiteren Bearbeitung nötig, eluiert werden.

Zur einfachen, raschen Überprüfung einer PCR wurden 0,8 %ige Agarosegele verwendet. Zur Herstellung dieser Gele wurde eine entsprechende Menge Agarose (BioBudget) in 1x TBE-Puffer aufgekocht. Nach Abkühlen auf 60°C wurde, zum Anfärben der DNA, dem noch flüssigen Agarosegel 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (EtBr) zugesetzt und in einen Elektrophoreseschlitten gegossen. Mittels eines Kammes wurden im Gel Taschen ausgespart, in welche die Proben geladen werden. Nach Erstarren des Gels wurde der Schlitten in die mit 1x TBE gefüllte Gel-Elektrophoresekammer überführt und je Geltasche mit einer Probe, bestehend aus 5 µl PCR-Produkt und 2 µl Ladepuffer, beladen. Weiter wurde eine Kammer mit einem Größenstandard (1kb, BioBudget), die der Abschätzung von Fragmentgröße und -menge dient, beladen. Zum Auftrennen der DNA-Fragmente wurde eine Spannung von 120 V für ca. 30 Minuten angelegt.

Die durch das EtBr angefärbten DNA-Fragmente wurden im Gel-Dokumentationssystem (Vilber Lourmat) mittels UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm dokumentiert.

3.1.6 Trennen von Doppelbanden

Bei manchen PCR-Produkten wurden nach der Gel-Elektrophorese Doppel- oder Mehrfachbanden festgestellt. Für eine weitere Bearbeitung war es nötig, diese Fragmente aufzutrennen. Die Auftrennung erfolgte gel-elektrophoretisch nach dem oben beschriebenen Verfahren. Für eine bessere Trennung der Fragmente wurde ein 1,5 % iges Agarosegel genutzt. Durch die höhere Agarosekonzentration musste die Laufzeit auf zweieinhalb bis drei Stunden, bei 120 V, erhöht werden. Die getrennten Fragmente wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit einem der Aufreinigungskits (BioBudget, Zymo-Research) nach Protokoll eluiert und aufgereinigt.

3.1.7 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden zur Vorbereitung der Sequenzierung mit Aufreinigungskits der Firmen BioBudget oder Zymo-Research nach Herstellerangaben aufgereinigt. Dieser Schritt entfernt die während der PCR benötigten Oligonukleotide, dNTP's, Salze, Polymerase und Puffer, welche die Sequenzierungsreaktion stören können.

3.1.8 Messung des DNA-Gehaltes der PCR-Produkte

Die Messung des DNA-Gehaltes der PCR-Produkte wurde mit einem Photometer (Eppendorf und Implen) nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.1.9 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung der aufgereinigten PCR-Produkte, welche nach einem quantitativen Vergleich mit dem 1kb-Marker (BioBudget) auf 0,5 µg/µl verdünnt wurden, erfolgte extern beim Sequenzierservice der Biochemie an der Ruhr-Universität Bochum mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger, Nicklen & Coulson 1977). Die Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von 4 pmol/µl abgegeben. Einfach degenerierte Primer wurden in einer Konzentration von 8 pmol/µl, mehrfach degenerierte Oligonukleotide wurden unverdünnt mit einer Konzentration von 100 pmol/µl abgegeben.

3.2 Methoden der Bioinformatik

Bei phylogenetischen Rekonstruktionen spielt die Bioinformatik eine immer stärkere Rolle. Dabei werden die Methoden der Bioinformatik seit den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts angewandt, seitdem die ersten Proteinsequenzen verfügbar sind, weswegen die ersten Analysemethoden auf Proteine ausgerichtet und abgestimmt waren (Hansen 2004). Die Zuverlässigkeit dieser Methode konnte von Fitch und Atchley (1988) anhand von Labormäusen, deren Phylogenie aufgrund langer Zucht bekannt war, nachgewiesen werden.

Ein wesentlicher Vorteil von molekularen Merkmalen ist ihre Eindeutigkeit. Werden in der Morphologie Begriffe wie groß – klein oder lila – violett verwendet, ergibt sich das

Problem, dass diese sehr subjektiv wahrgenommen werden. Molekulare Merkmale stellen dagegen jeweils eigene, selbstständige Attribute dar – so sind die vier Basen der DNA chemisch und physikalisch genau definiert und somit eindeutig.

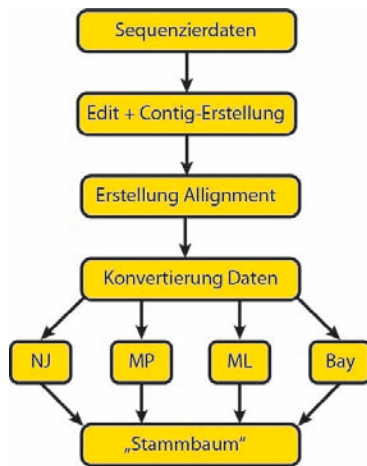


Abb. 5: Arbeitsabläufe Bioinformatik

Die für die phylogenetische Rekonstruktion nötigen Arbeitsabläufe umfassen folgende Schritte (Abb. 2): Die bei der Sequenzier-Reaktion gewonnenen Daten, in der Regel in Form von Pherogrammen, werden in einem ersten Schritt gesichtet und gegenläufige Sequenzen in einem sogenannten Contig, einem Set sich überlappender DNA-Stücke, zusammengeführt. Aus den so erhaltenden Sequenzen wird ein Alignment erstellt, dessen Daten je nach weiteren Bearbeitungsschritten in verschiedene Dateiformate gewandelt werden muss. Abschließend werden mit verschiedenen Programmen und Algorithmen die Phylogenien berechnet.

3.2.1 Assembling

Die Sequenzen wurden aus den erhaltenen Pherogrammen vom Sequenzieren mit den Programmen Sequencher 4.8 oder DNA Baser 3.0.24 ausgelesen und konnten dann editiert werden. Um die Aussagekraft und die Qualität der Sequenzen für die Analyse zu erhöhen, wurde jeder Genabschnitt mit zwei gegenläufigen Primern (= ein Primerpaar) amplifiziert und die so gewonnenen Sequenzen an den Überlappungsstellen untereinander angeordnet. Diese Methode ermöglicht es, qualitativ schlechtere Sequenzabschnitte zu bearbeiten, da in der Regel eine der beiden Sequenzen eine ausreichende Qualität aufweist um entscheiden zu können, wie die Konsensussequenz (Contig) zusammengesetzt ist. Diese werden im weiteren Verlauf wieder als Sequenzen angesprochen.

3.2.2 die Überprüfung der gewonnenen Sequenzen

Um zu überprüfen, ob die gewonnenen Sequenzen zur Gattung *Urocystis* gehören, wurden diese mit den bei GenBank hinterlegten Sequenzen abgeglichen. Dies geschah mittels des BLASTn-Algorithmus (Altschul u.a. 1990) unter Ausschluss der „Uncultured/environmental sample sequences“ und einer Optimierung für „Highly similar se-

quences (megablast)“ (Zhang u.a. 2000). Dabei vergleicht der BLASTn-Algorithmus eine Nukleotidsequenz gegen eine Nukleotidsequenzdatenbank und zeigt als Ergebnis eine Reihe lokaler Alignments mit ähnlichen Sequenzabschnitten aus der Datenbank, zusammen mit der Signifikanz der gefundenen Ergebnisse. Anhand dieser Ergebnisse konnte dann entschieden werden, ob es sich um den untersuchten Organismus handelte, oder ob eine Kontamination vorlag. Da sehr wenige verschiedene Sequenzen der Gattung *Urocystis* bisher bei GenBank hinterlegt sind, wurden als Positivergebnisse auch die Ergebnisse angenommen, welche nahe verwandte Gattungen, wie *Vankya* oder *Melanotaenium*, anzeigten.

3.2.3 Die Alignierung der Sequenzen

Beim Alignieren werden die verschiedenen Sequenzen so untereinander gestellt, dass die homologen Positionen untereinander zu liegen kommen. Aufgrund von Insertions- und Deletionsprozessen im Laufe der Evolution kann es dazu nötig sein, dass in die Sequenzen Lücken (Gaps) eingeführt werden müssen.

Die Sequenzen, welche in die Untersuchung eingeflossen sind, wurden mit dem Programm MAFFT v6.821b (Katoh & Toh 2008) aligniert. Für die Alignierung wurde die L-INS-i Option, welche ein lokales Alignment mittels des Smith-Waterman-Algorithmus berechnet, verwendet. Ziel des Smith-Waterman-Algorithmus, eine Erweiterung des Needle-Wunsch-Algorithmus, ist es, Teilsequenzen mit der größten Übereinstimmung zu finden. Dazu arbeitet er mit Scoring-Funktionen, aus denen eine Ähnlichkeitsmatrix abgeleitet wird.

Da nicht bei allen Proben die Amplifikation oder Sequenzierung der drei Genregionen ITS, LSU und TEF1 erfolgreich war, mussten bei den Alignments die entsprechenden Reihen aufgefüllt werden dazu wurde N verwendet (s. Anhang 2)

3.2.4 Überprüfung der Alignments

Die gewonnenen Alignments wurden mit den Programmen BioEdit 7.0.5.3 (Hall 1999) und Mega4.1 (Tamura u.a. 2007) visuell überprüft. Von besonderem Interesse war, ob die Sequenzen im Alignment alle in der gleichen Orientierung vorlagen, oder ob Sequenzen mit einbezogen wurden, welche das Alignment durch die Notwendigkeit des

Einfügen von Lücken während des Alignierens zu sehr auseinanderzogen. Dies kann unter anderem bei der Wahl einer Außengruppe mit zu großer genetischer Distanz passieren. In so einem Fall wurde die nicht alignierte Ausgangsdatei korrigiert und die Alignierung erneut durchgeführt.

3.2.5 Auswahl der Substitutionsmodelle

Der Vorteil, dass in Nukleotidsequenzen alle Merkmale eindeutig definiert sind, hat auf der anderen Seite den Nachteil, dass deren Geschichte nicht rekonstruierbar ist. So können

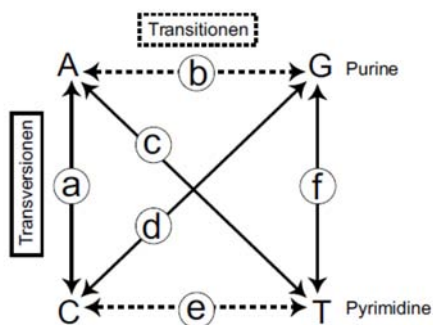


Abb. 6: Substitutionen nach (Knoop & Müller 2009)

im Extremfall bei zwei verschiedenen Sequenzen an der gleichen Position gleiche Basen vorkommen, welche aber verschiedene Hintergründe aufweisen, die wiederum verschiedene Substitutionschritte oder Rückmutationen beinhalten. Bei Substitutionen wird zwischen Transitionen und Transversionen (Abb. 3) unterschieden. Unter einer Transition versteht man einen Austausch zwischen den beiden Pyrimidinbasen oder zwischen den beiden Purin-

basen. Bei einer Transversion handelt es sich um den Austausch einer Purinbase gegen eine Pyrimidinbase, oder umgekehrt. Um dies in den phylogenetischen Rekonstruktionen zu berücksichtigen, wurden Substitutionsmodelle mit unterschiedlichen Parametern entwickelt. Die gängigsten Substitutionsmodelle sind Jukes-Cantor (JC), Kimura-zwei-Parameter (K2P), Felsenstein (F81) und General Time Reversible (GTR). Alle Substitutionsmodelle greifen auf eine Substitutions-Wahrscheinlichkeits-Matrix zurück, die in ihrer Grundform wie folgt aussieht:

$$P = \begin{pmatrix} \cdot & P_{AC} & P_{AG} & P_{AT} \\ P_{CA} & \cdot & P_{CG} & P_{CT} \\ P_{GA} & P_{GC} & \cdot & P_{GT} \\ P_{TA} & P_{TC} & P_{TG} & \cdot \end{pmatrix}$$

Das älteste - und gleichzeitig auch einfachste - Substitutionsmodell ist das Jukes-Cantor-Modell von 1969, bei dem die Annahme aufgestellt wurde, dass alle Substitutionsereignisse mit der gleichen Wahrscheinlichkeit auftreten, $a=b=c=d=e=f$ (Abb. 6.3). Da dies jedoch nicht der Fall ist, wurde 1980 von Kimura ein neues Modell, K2P, vor-

gestellt (Kimura 1980). Dieses berücksichtigt, dass Transitionen fast immer stärker auftreten als Transversionen, so dass $a=c=d=f$ und $b=e$ gilt (Kimura 1980) (Abb. 6).

Beim F81-Modell von Felsenstein (1981) werden hingegen die relativen Häufigkeiten der verschiedenen Nukleotide berücksichtigt, mit π_A , π_C , π_G und π_T . Es behandelt jedoch die Substitutionswahrscheinlichkeit analog zum Jukes-Cantor-Modell mit $a=b=c=d=e=f$. Das HKY-Modell von 1985 (Hasegawa, Kishino & Yano 1985) führt die Annahmen aus dem K2P- und F81-Modell zusammen, mit π_A , π_C , π_G und π_T , sowie $a=c=d=f$ und $b=e$. Beim GTR-Modell (Tavaré 1986), dem zur Zeit komplexesten Modell, werden sowohl verschiedene Substitutionswahrscheinlichkeiten als auch die relativen Häufigkeiten der Nukleotide mit π_A , π_C , π_G und π_T , und a , c , d , f , b und e berücksichtigt.

Um das geeignete Substitutionsmodell für die phylogenetischen Analysen für diese Arbeit zu finden, wurde MrModeltest 2.3 (Nylander 2004) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine modifizierte, an das Programm MrBayes angepasste Variante von Modeltest (Posada & Crandall 1998), bei der die berücksichtigten Substitutionsmodelle von 54 auf 26 reduziert wurden. Da nicht immer alle Ergebnisse des Programms MrModeltest 2.3 eindeutig sind, wird für die endgültige Entscheidung auf Informationskriterien zurückgegriffen. Für diese Arbeit kam dafür das Akaike Information Criterion (AIC) zur Anwendung, welches bei MrModeltest implementiert ist.

Für die phylogenetische Rekonstruktion wird, mit dem Alignment als Grundlage, zwischen Distanzverfahren und Merkmalsverfahren (diskretes Verfahren) unterschieden. Die Methoden, die sich einer Distanzmatrix bedienen, sind Neighbour-Joining (NJ), Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPMGA), Minimum-Evolution (ME) und Least Squares (LS), wovon heute vor allem noch NJ eine breitere Anwendung findet. Auf Merkmalsmethoden greifen Maximum Parsimony (MP), Maximum Likelihood (ML) und bayessche Analytik (BAY) zurück, welche zurzeit eine breitere Anwendung finden.

Bei den Distanzmatrixmethoden wird für die Baumberechnung nicht direkt auf die Sequenz zurückgegriffen, sondern aus den Sequenzen wird mit Hilfe von Substitutionsmodellen eine Distanzmatrix mit paarweisen Distanzen erstellt, aus denen anschließend der Stammbaum erstellt wird. Bei den Merkmalsverfahren hingegen wird im Alignment jede Position als informative Einheit angesehen.

3.2.6 Das Neighbour-Joining

Neighbour-Joining (Saitou & Nei 1987) ist ein Clusteringverfahren zur phylogenetischen Rekonstruktion, bei dem paarweise OTU's (operational taxonomic units) zusammengeführt werden (Clustering). Nach dem Zusammenfügen wird jedes OTU-Paar als eigenständiges OTU behandelt. Die Baumkonstruktion startet mit einem sternförmigen Baum (Abb.7) bei dem alle Äste gleich lang und keine OTU's zusammengeführt sind. Im nächsten Schritt werden die beiden OTU's zusammengeführt, welche die geringste Distanz S_{ij} aufweisen, die aus der Distanzmatrix M berechnet werden, so dass der erste Knoten entsteht (Abb.7)

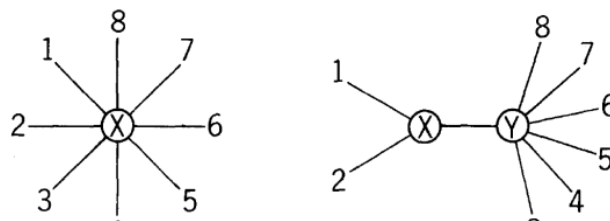


Abb. 7: Anfang NJ-Analyse nach (Saitou & Nei 1987)

Nach diesem Schritt wird eine neue Matrix M_2 erstellt, in der die zusammengeführten OTU's eine eigene OTU darstellen, aus der wiederum eine weitere S_{ij} -Matrix erstellt wird. Dies wird solange wiederholt, bis nur noch drei OTU's übrig sind und somit auch der Baum fertig ist. (Saitou & Nei 1987; Studier & Keppler 1988)

3.2.7 Bootstrapping

Die phylogenetischen Rekonstruktionsmethoden als solche sind, bis auf die bayessche Analyse, nicht auf ihre statistische Verlässlichkeit überprüft. Um diese zu ermitteln, bedient man sich sehr häufig des Bootstrapping (Felsenstein 1985). Beim Bootstrapping handelt es sich um ein Resamplingverfahren, welches ursprünglich auf Efron (1979) (Zitat aus: Rudolf & Kuhlisch 2008) zurückgeht. Diese Technik hat das Ziel, aus sehr kleinen Stichproben Parameterabschätzungen oder statistische Entscheidungen abzuleiten. Das Prinzip besteht darin, aus der gegebenen Stichprobe eine große Anzahl von Bootstrap-Stichproben mit Zurücklegen zu ziehen. Für alle diese Stichproben, welche gleichen Umfangs sein müssen wie die Originalstichprobe, kann dann ein statistischer Kennwert berechnet werden (Knoop & Müller 2009).

In der Phylogenie werden dazu aus dem Alignment eine Bootstrap-Merkmalismatrix erstellt, aus denen jeweils ein neuer Baum berechnet wird. Aus den gewonnenen Bäu-

men wird dann ein Konsensusbaum rekonstruiert, welcher die Häufigkeiten der einzelnen gefundenen Knoten angibt (Knoop & Müller 2009).

Die Neighbour-Joining-Analysen mit Bootstrap-Berechnung wurden mit PAUP*4.0b10 durchgeführt (Befehle s. ANLAGE).

3.2.8 Maximum Parsimonyanalyse (MP)

Das Parsimony-Prinzip ist, zumindest gedanklich, das einfachste Prinzip. Es besagt, dass die einfachste, sparsamste Möglichkeit die Richtige sein muss, und somit den anderen vorgezogen werden soll. Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode, neben der logischen Einfachheit, liegt darin, dass sie nur wenig Rechnerkapazität benötigt (Knoop & Müller 2009).

Bei Maximum Parsimony wird jede Position im Alignment als eigenes, diskretes Merkmal betrachtet, welches bestimmte Merkmalszustände, bei einer DNA-Sequenz A, T, G und C, annehmen kann. Jede Änderung eines Merkmalszustandes wird als „Step“ bezeichnet. Am Ende wird derjenige Baum als „*best tree*“ - „bester Baum“ - bezeichnet, der diese Veränderungen mit einer minimalen Anzahl von „*steps*“ erklärt. Nicht beachtet wird, dass eine Merkmalsänderung über mehrere Schritte erfolgen kann.

Die Merkmale bei der MP werden eingeteilt in parsimony-informativ und parsimony-uninformativ. Uninformative Merkmale sind all diejenigen, die konstant (invariabel) sind, also bei allen Taxa im Alignment den gleichen Zustand aufweisen, sowie die variablen Merkmale, die bei lediglich einem Taxon vorkommen. Parsimonie-informative Merkmale müssen in mindestens zwei Zuständen bei mindestens zwei Taxa vorkommen (Knoop & Müller 2009).

Die Maximum-Parsimonyanalysen (MP) mit Bootstrap-Berechnung wurden mit PAUP*4.0b10 durchgeführt (Befehle s. ANLAGE)

3.2.9 Maximum-Likelihood-Verfahren (ML)

Bei dem Maximum-Likelihood-Verfahren handelt es sich um ein statistisches Schätzverfahren, welches prüft, bei welchen Parametern die Grundgesamtheit aller Daten am wahrscheinlichsten ist. Dazu muss das Maximum der ML-Funktion gefunden werden.

Unter Umständen kann eine ML-Funktion mehrere (lokale), oder auch keine Maxima aufweisen.

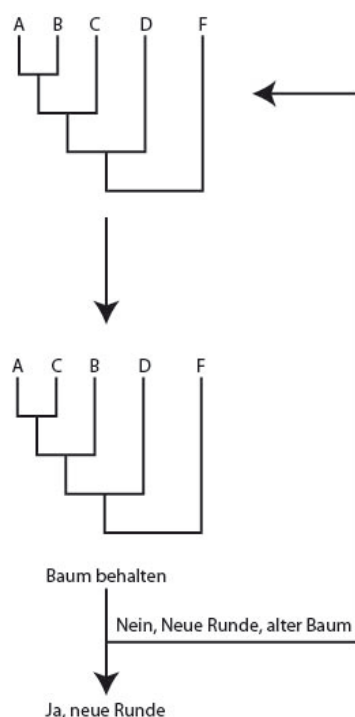
Während die Sachlage bei den externen Knoten, die durch die vorhandenen Sequenzen beschrieben werden, eindeutig ist, ist dies bei den inneren Knoten nicht der Fall. Bei diesen ist nicht bekannt, welche Base an einer bestimmten Position bei einem gemeinsamen Vorfahren vorzufinden war. Dies macht es notwendig, alle theoretisch denkbaren Szenarien zu berechnen, was mithilfe von Substitutionsmodellen geschieht. Da es sich hierbei um sich gegenseitig ausschließende Ereignisse handelt, liefert ihre Summe die Wahrscheinlichkeit, welches der Szenarien zutrifft. Bei einem ungewurzelten Baum mit, z. B., vier Taxa und 2 inneren Knoten bestehen bereits 16 Möglichkeiten, über die summiert werden muss. (Felsenstein 1981), (Knoop & Müller 2009), (Ludwig-Mayerhofer 2010)

Die ML-Analyse wurde mit RAxML 7.2.6 (Stamatakis, Ludwig & Meier 2005; Stamatakis) durchgeführt, unter Nutzung von raxmlGUI v.0.9b2 (Silvestro & Michalak). (Kommandos s. Anlage 3)

3.2.10 Die Bayessche Statistik (Bay)

Anders als die ML-Analyse beschäftigt sich die bayessche Statistik nicht mit der Likelihood, sondern mit a-Posteriori-Wahrscheinlichkeiten, bei denen aus einer „Wirkung“ auf ein Ereignis geschlossen wird.

Anders als bei ML ist das Ziel nicht nur einen Baum zu erhalten, vielmehr soll die gesamte Posterioriverteilung berechnet werden, um ein „credibility interval“ abzuleiten,



welches die Unsicherheit und Ungenauigkeit der gewonnenen Daten widerspiegelt. Dafür bedient sich die bayessche Statistik einer sogenannter Markovkette, bei der die Wahrscheinlichkeit einer Veränderung nur vom aktuellen Zustand abhängt. Diese Kette weist eine stationäre Verteilung auf, wenn sie hinreichend lang ist und bestimmte Bedingungen erfüllt. Ist dies gegeben, folgen die auftretenden Zustände einer Wahrscheinlichkeitsverteilung und hängen nicht mehr von der Anzahl der Kettenglieder ab.

Zuerst wird aus einem Startbaum ein neuer Baum konstruiert (Abb.8), welcher auf die Frage überprüft wird, ob die-

Abb. 8: Schema Baumsuche in MrBayes

ser für die Erschaffung eines neuen Kettengliedes verwendet werden soll.

Bei der phylogenetischen Rekonstruktion mit MrBayes wird auf den Metropolis-Hastings-Green-Algorithmus, einer Markovketten-Variante, zurückgegriffen (Knoop & Müller 2009; Huelsenbeck u.a. 2001). Dabei wird aus einem Startbaum (durch den Anwender vorgegeben oder vom Programm zufällig erstellt), welcher den Anfangspunkt der Kette darstellt und bestimmte Parameter (Topologie, Zweiglängen, Substitutionsparameter) aufweist, ein neuer Baum, T_j berechnet. Bei dieser Berechnung werden die Parameter zufällig geändert. Für die anschließende Entscheidung, welcher der beiden Bäume weiter verwendet werden soll, wird der Quotient A der „posterior probabilities“ beider Bäume berechnet.

Bei $A \geq 1$ wird der neue Baum akzeptiert, bei $A < 1$ wird eine Zufallszahl zwischen 0 und 1 generiert und der neue Baum dann akzeptiert, wenn diese kleiner A ist. Danach startet so oft eine neue Runde – bei MrBayes Generation genannt – bis die vom Anwender vorgegebene Zahl erreicht ist (Knoop & Müller 2009).

Um das bei Maximum-Likelihood eventuell auftauchende Problem der lokalen Maxima zu umgehen, verwendet MrBayes eine spezielle Variante des MCMC's, die Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo – MCMCMC. Dieser Algorithmus ermöglicht es lokale Maxima (Unwahrscheinlichkeitsabgründe) zu überspringen, wozu normales ML als solches nicht in der Lage ist. Das wird dadurch ermöglicht, dass mehr als eine Kette gleichzeitig läuft, von denen einige „erhitzt“, das heißt die „posterior probabilities“ erhöht, werden (Knoop & Müller 2009; Huelsenbeck u.a. 2001).

Die Bayessche-Analyse wurde mit MrBayes 3.2 (Ronquist 2010; Huelsenbeck u.a. 2001) durchgeführt. Die Berechnungen wurden so lange durchgeführt, bis die „split frequencies“ dauerhaft unter 0,01 lagen. (Kommandos s. Anlage 3)

4 Ergebnisse

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse, angefangen bei den erfolgreich amplifizierten Genregionen über die Gen-Regionen bei denen keine Amplifikation nachweisbar zu den phylogenetischen Rekonstruktionen, dargestellt.

4.1 Ergebnisse der PCR

Die verschiedenen PCR-Reaktionen waren insgesamt sehr unterschiedlich erfolgreich. So konnten vor allem bei den verbreitet genutzten DNA-Markern, ITS, LSU und TEF1, von einer großen Anzahl verschiedener Aufsammlungen Amplifikate gewonnen werden. Von einigen DNA-Isolationen konnten keine Amplifikate erfolgreich nachgewiesen werden (s. Tabelle im Anhang). Dies war unter anderem auch bei der Typus-Art *Urocystis occulta* der Fall, welche somit nicht in die weiteren Analysen einfließen konnte.

4.1.1 Internal Transcribed Spacer (ITS)

Die ITS-Region wurde für 110 DNA-Isolationen versucht zu amplifizieren. Bei 23 von diesen konnten keine Amplifikate nachgewiesen werden. Nach Ausschluss von nicht erfolgreich sequenzierten Proben, Sequenzen mit schlechter Qualität oder Kontaminationen konnten 69 Sequenzen für die weiteren Bearbeitungsschritte gewonnen werden.

4.1.2 Large Subunit (LSU)

Die Amplifikation der LSU-Region wurde bei 44 DNA-Isolationen versucht, wovon bei 43 Isolaten Amplifikate nachgewiesen wurden. Von diesen konnten 39 Sequenzen für die weitere Untersuchung genutzt werden. Die Ausschlusskriterien entsprachen bei allen Amplifikaten den oben genannten. Zusammen mit den zur Verfügung gestellten Sequenzen waren damit 71 Sequenzen verfügbar.

4.1.3 Translation Elongation Factor 1 α (tef1):

Bei 73 DNA-Isolationen wurde versucht die TEF1-Region zu amplifizieren, von denen bei 71 Amplifikate nachgewiesen wurden. Insgesamt 57 Sequenzen gingen in die weiteren Untersuchungen ein.

4.1.4 Left Border A Locus (lba)

Die PCR-Reaktionen mit dem Primerpaar RoK245 / RoK248, der ursprünglich für *Ustilago maydis* entwickelt wurde, zeigten wenige Amplifikate. Die Ausbeute an Amplifikaten konnte mit dem Primerpaar RoK354 und RoK355, welche anhand der Sequenzen von RoK245 / RoK248 entwickelt wurden, deutlich erhöht werden. Mit dem noch weiter entwickelten Primerpaar SLE001 und SLE002 konnte letztendlich die Zahl der Amplifikate von 48 verschiedenen DNA-Isolationen von 22 auf 28 erhöht werden. In den weiteren Untersuchungen wurden 23 der Sequenzen genutzt.

4.1.5 Andere Regionen:

Bei den anderen Regionen, ATP6, β -TUBULIN, COX3, IGS, RPB1 und RPB2 konnten während der Testläufe, die nur eine begrenzte Anzahl von DNA-Isolationen beinhalteten, mit den vorhandenen Primern keine Amplifikate erfolgreich nachgewiesen werden. Diese Ansätze wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

4.2 Phylogenetische Rekonstruktion

Die Ergebnisse werden hier, nach einer Besprechung der LBA-Phylogenie, von der Multigen-Analyse ausgehend erörtert. Dabei wird untersucht, inwieweit diese durch die Einzelgen-Analysen gedeckt wird.

Zur endgültigen Auswertung wurden diejenigen Analysen verwandt, in der jede *Urocystis*-Art durch einen Vertreter repräsentiert ist. Da in der Regel für jede *Urocystis*-Art Sequenzen aus mehreren Belegen vorhanden sind, wurde der Vertreter für die finale Multigen-Phylogenie in vorhergehenden phylogenetischen Untersuchungen, in die alle

gewonnenen Sequenzen eingeflossen sind, ermittelt. Kriterium war, dass alle Vertreter einer Art zusammen monophyletisch gruppiert sein mussten. Aus dieser Gruppe wurde diejenige Isolation ausgewählt, von der möglichst viele DNA-Regionen erfolgreich amplifiziert waren. War die Gruppierung nicht monophyletisch, wie bei *Urocystis bromi* und *Urocystis agropyri*, wurden je zwei Vertreter mit in die Analyse aufgenommen. Auf eine Nachbestimmung bei den Herbarbelegen wurde verzichtet, da diese von zwei verschiedenen Mykologen bereits erfolgt war.

4.2.1 Ergebnisse der lba-Analyse

Das in der LBA-Analyse verwendete Alignment enthält 24 Sequenzen von verschiedenen Aufsammlungen und weist nach der Alignierung mit Mafft und dem Editing mit gBlocks (Talavera & Castresana 2007) eine Länge von 313 Basenpaaren (bp) auf. 109 der Positionen sind konserviert, 204 variabel und 89 parsimony-informativ.

Die Phylogenie der LBA-Region (Anhang 4) zeigt nur schwach unterstützte Gruppierungen und ist zudem schwach aufgelöst. Auffällig ist, dass *Urocystis primulae* als Schwesertaxon zu den anderen Arten gestellt wird.

4.2.2 Ergebnisse der Multigen-Analysen

Das in der Multigen-Analyse verwendete Alignment enthält 39 verschiedene Sequenzen von 38 verschiedenen Arten. Die Art *Urocystis bromi* ist doppelt vertreten. Nach der Alignierung mit Mafft weist das Alignment eine Länge von 2116 bp auf. 1420 der Positionen sind konserviert, 615 variabel und 292 parsimony-informativ. Die Bayessche Statistik zeigt die höchsten Unterstützungswerte.

In der Multigen-Phylogenie, welche durch *Antherospora vaillantii* gewurzelt ist, sind zwei sehr große Gruppen zu erkennen, die als Schwestergruppen einander gegenübergestellt sind (Abb.9-11). Eine Gruppe umfasst im Wesentlichen Vertreter derjenigen *Urocystis*-Arten, die auf Monokotyledonen, hier Poales, Liliales und Asparagales parasitieren, sowie Vertreter der Gattung *Melanoxa*. Die andere Gruppe umfasst im Wesentlichen diejenigen Vertreter, die auf Dikotyledonen parasitieren. Diese beiden großen Gruppen werden mit weiteren Vertretern von *Urocystis* und anderen Arten, welche nicht

its+lsu+tef
MP
BS 1000

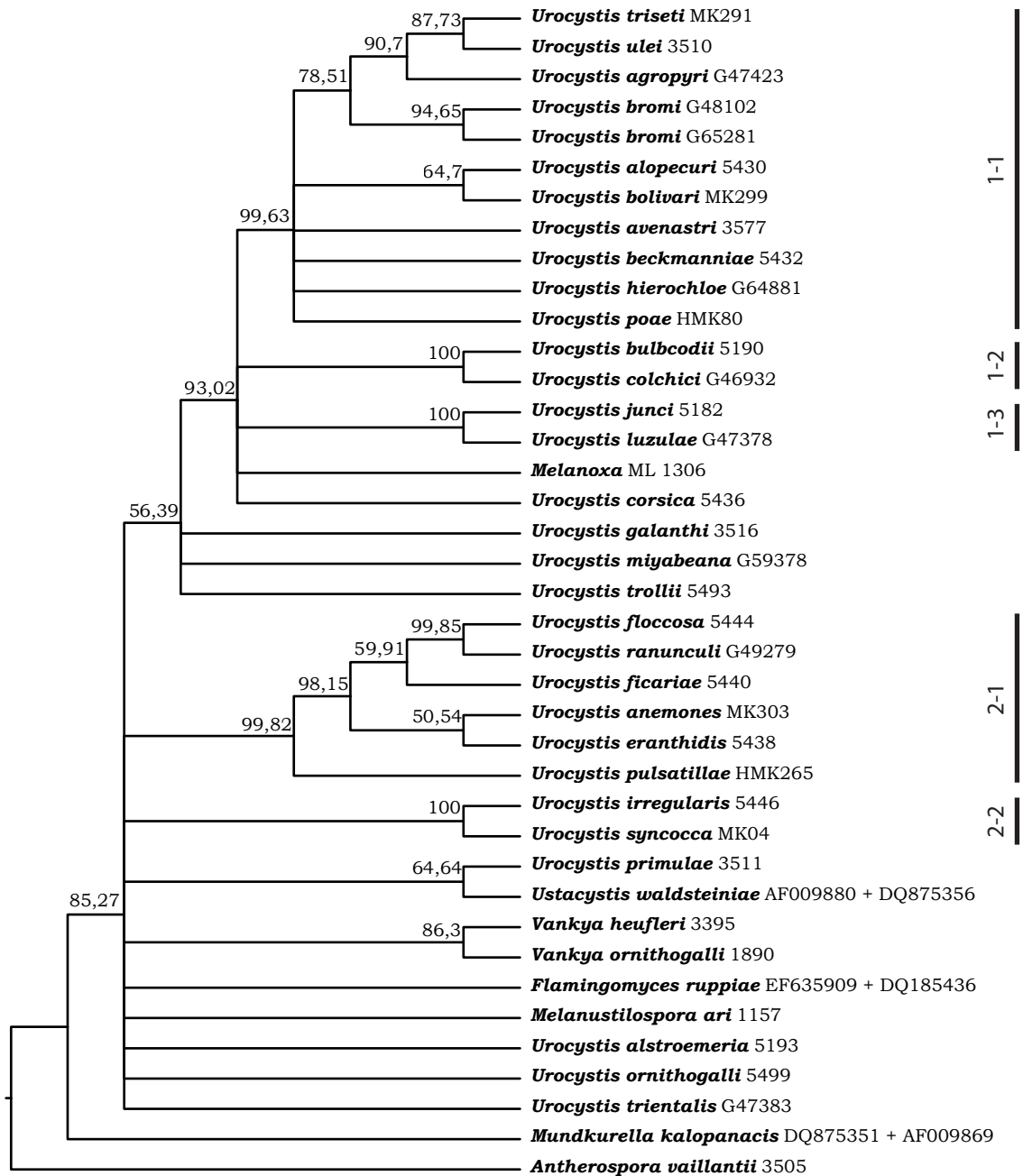


Abb. 9: Maximum-Parsimony-Analyse des Multigen-Alignments, BS>50 sind angegeben

its+lsu+tef
 NJ
 BS 1000

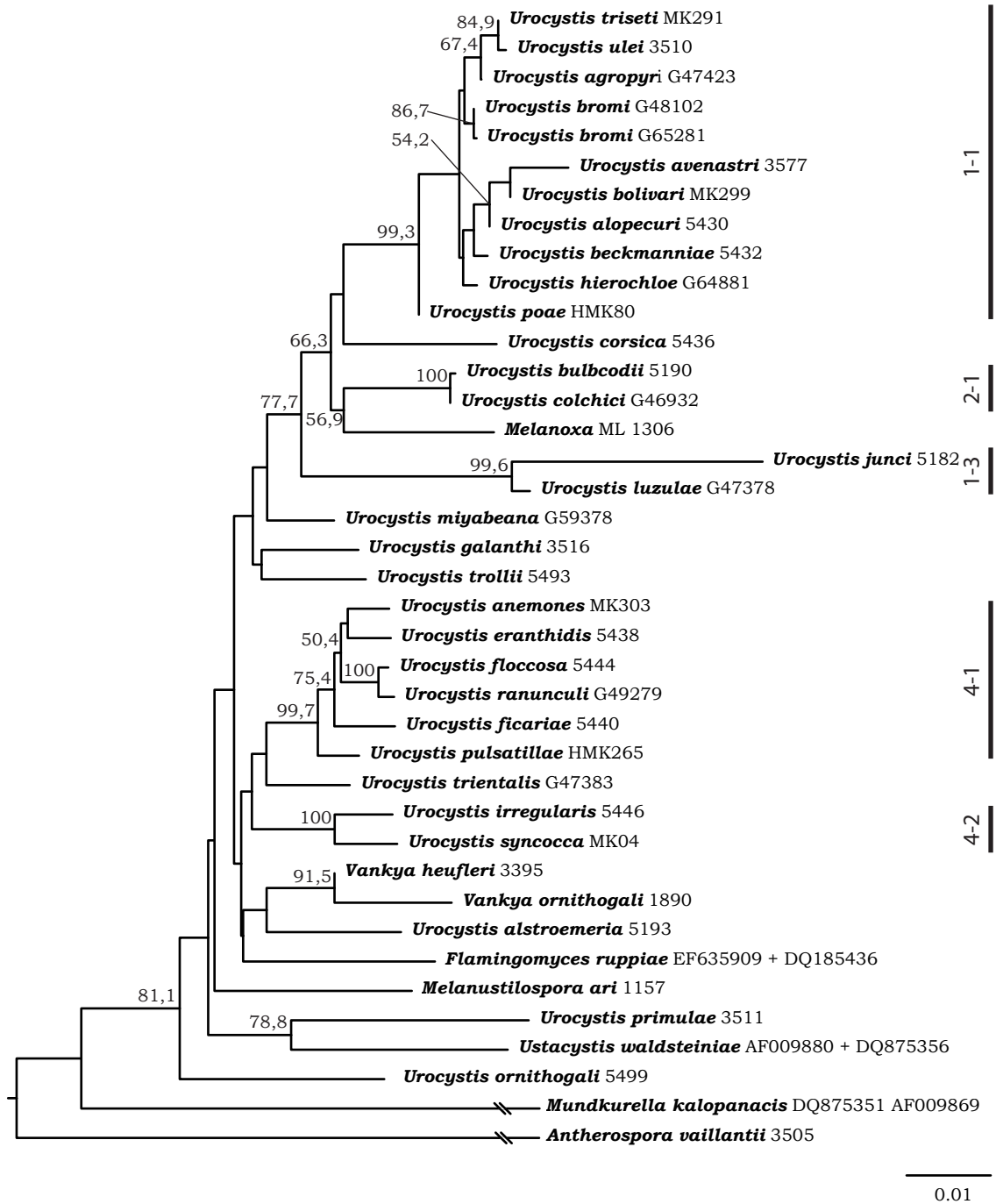


Abb. 10: Neighbour-Joining-Analyse des Multigen-Alignments, BS>50 sind angegeben

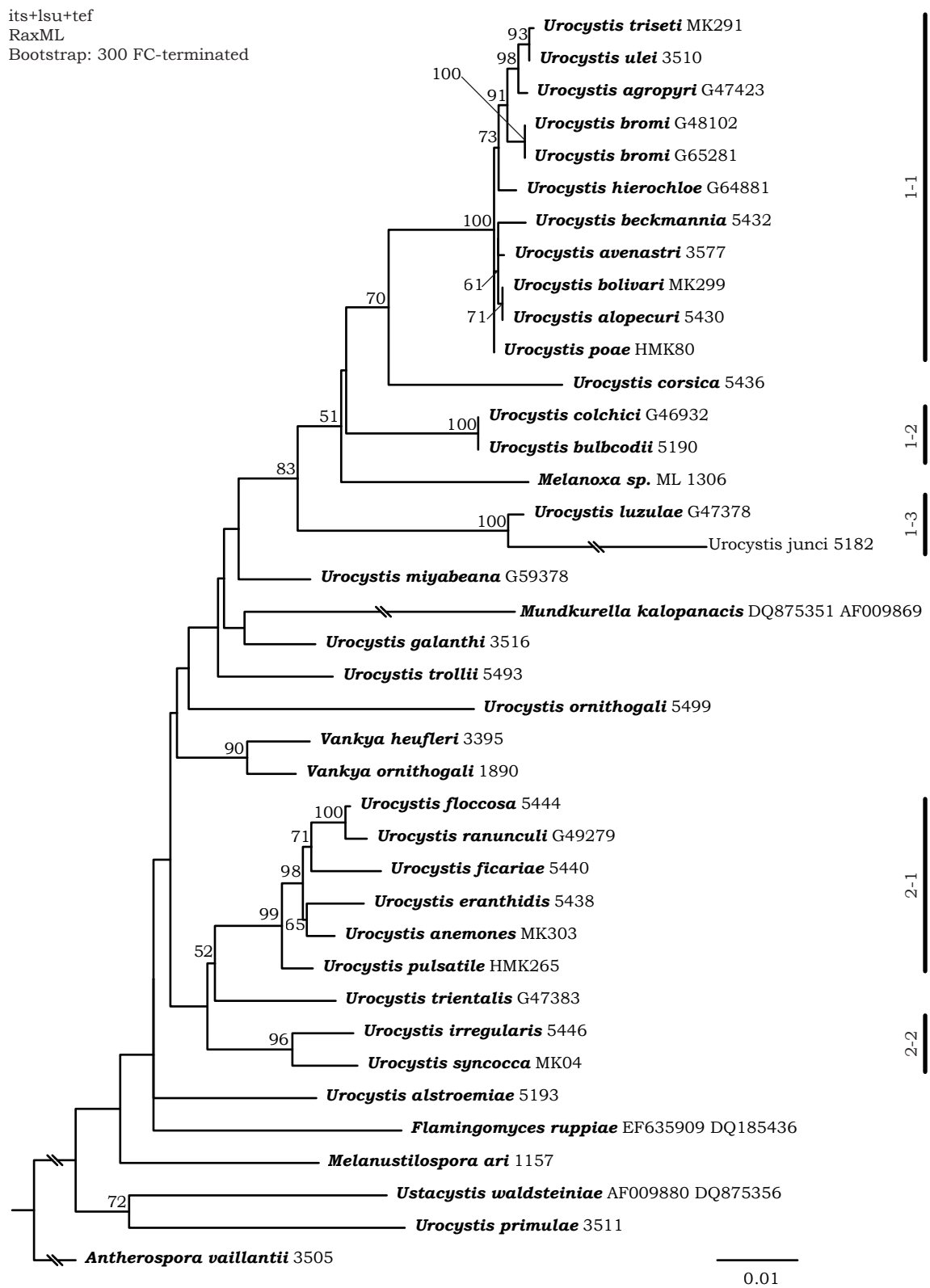


Abb. 11: Maximum-Likelihood-Analyse des Multigen-Alignments, BS>50 sind angegeben

its+lsu+tef
MrBayes
5.000.000 Generationen

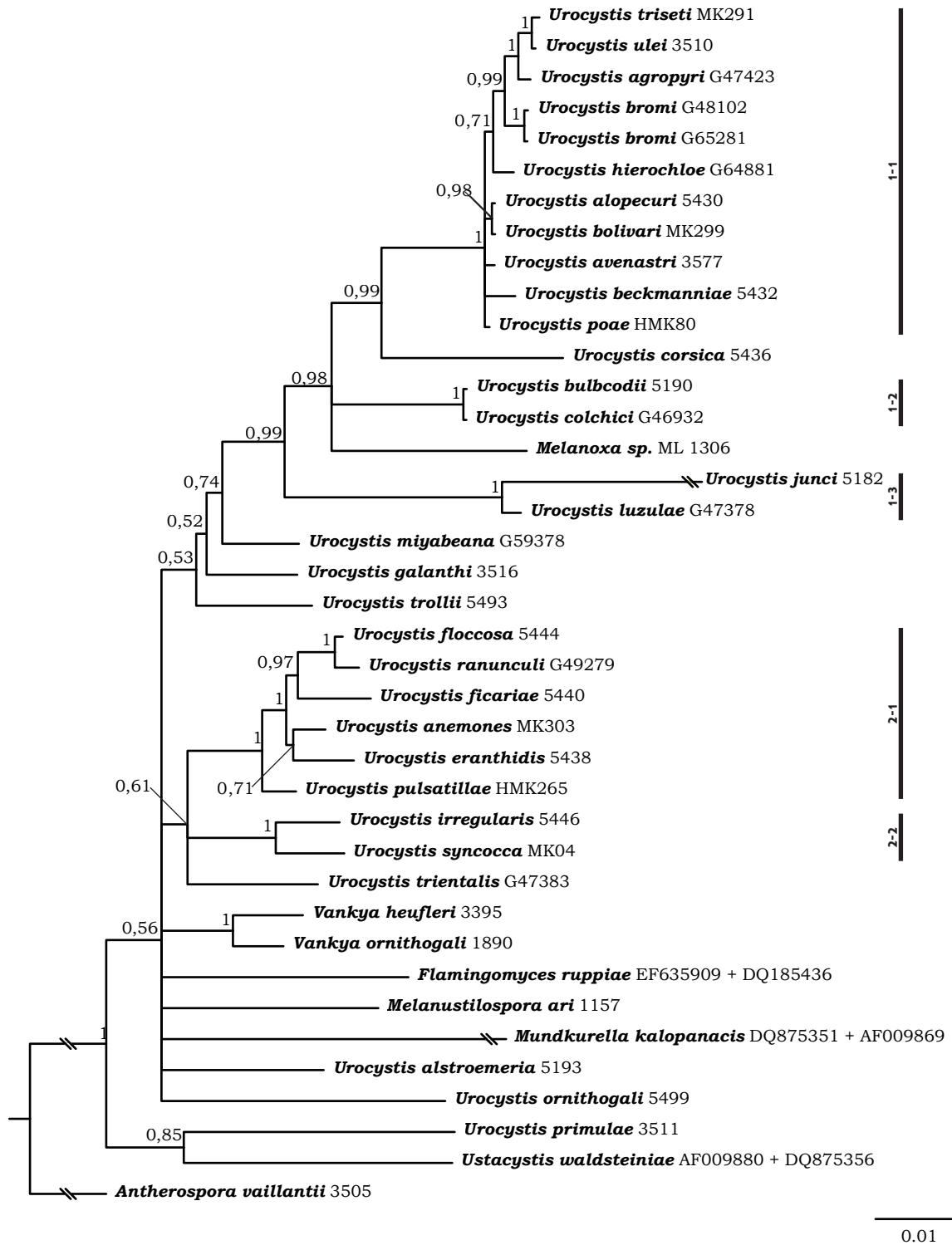


Abb. 12: Bayessche Analyse des Multigen-Alignments, $pp > 50$ sind angegeben

eindeutig platziert sind, zusammen gruppiert. Dieser Komplex wird als Schwestergruppe zu einer kleinen Gruppe gestellt, die aus *Urocystis primulae* und *Ustacystis waldesteiniae* gebildet wird.

Weiter konnten in diesen großen Gruppen mehrere monophyletische terminale Gruppen identifiziert werden. Eine der Gruppen umfasst im Wesentlichen die *Urocystis*-Arten, welche auf den Poaceen parasitieren. Die andere repräsentiert einen größeren Teil der Arten, welche auf Ranunculaceen parasitieren. Diese beiden Gruppen werden durch die vier verschiedenen Analysemethoden mit Unterstützungswerten von 96-100 % gestützt.

Die Gruppe der Poaceen-Parasiten (Gruppe 1-1) umfasst dabei *Urocystis triseti*, *Urocystis ulei*, *Urocystis agropyri*, *Urocystis bromi*, *Urocystis hierochloe*, *Urocystis alopecuri*, *Urocystis bolivari*, *Urocystis avenastri*, *Urocystis beckmanniae* und *Urocystis poae* (Abb.9-12). Diese Gruppe wird bei allen vier phylogenetischen Analysen (Bayessche Statistik, Maximum Likelihood, Neighbour-Joining, Maximum Parsimony) mit Unterstützungswerten von 96-100 % unterstützt. Die Stellung von *Urocystis corsica*, welche auch auf Poaceen parasitiert, ist in allen Fällen basal zur Poaceen-Gruppe, allerdings mit verschiedenen, nicht immer aussagekräftigen Unterstützungswerten. In den überwiegenden Fällen steht *Urocystis corsica* isoliert, außer bei der Maximum-Parsimony-Analyse (Abb.9), welche die Stellung von *Urocystis corsica* nicht auflösen kann.

Gruppe 1-1 scheint sich, zumindest in den Maximum-Likelihood- und Neighbour-Joining-Analysen (Abb10+12), weiter zu unterteilen. So sind bei Maximum-Likelihood (Abb.11) zwei Gruppen zu erkennen. Eine Gruppe, mit relativ guten Unterstützungswerten, besteht aus *Urocystis triseti*, *Urocystis ulei*, *Urocystis bromi* und *Urocystis hierochloe*. Die andere Gruppe, mit weniger guten Unterstützungswerten, besteht aus *Urocystis beckmanniae*, *Urocystis avenastri*, *Urocystis bolivari*, *Urocystis alopecuri* und *Urocystis poae*. In der Neighbour-Joining-Analyse sieht es ähnlich aus, wenn auch *Urocystis hierochloe* aus der Topologie herausfällt und sich in der anderen Gruppe findet. Die Gruppe um *Urocystis triseti* zeigt sich auch bei den beiden anderen Multigen-Analysen.

Gruppe 1-2 wird weiter unten beschrieben.

Als weitere abgesicherte Gruppe, welche in die Gruppe der Poales-Parasiten fällt, ist die Gruppe der Juncaceen-Parasiten erkennbar, bestehend aus *Urocystis junci* und *Urocystis luzulae* (Gruppe 1-3) (Abb. 9-12). Diese Gruppierung weist in allen Fällen eine sehr

gute Absicherung auf und steht als Schwestergruppe zur Poaceen-Gruppe, bzw. basal in der ganzen Poales-Gruppe.

Die Vertreter der Asparagales-parasitierenden, *Urocystis miyabeana* und *Urocystis galanthi*, werden bei allen vier verschiedene Analysen (Abb.9-12) nicht zusammengefasst. Sie finden sich jedoch in der Monokotyledonen-Gruppe (Gruppen 1-1, 1-2, 1-3) wieder. *Urocystis miyabeana* wird in allen Fällen isoliert dargestellt. *Urocystis galanthi* ist bei der Neighbour-Joining-Analyse (Abb.10) mit *Urocystis trollii*, bei der Maximum-Likelihood-Analyse (Abb.11) mit *Mundkurella kalopanacis* zusammengruppiert. Beide Fälle weisen jedoch keine signifikante Unterstützung auf. Zwischen den Gruppen 1-1 und 1-3, der Poales-Gruppe (Abb.11), steht *Melanoxa sp.* sowie eine weitere sehr gut unterstützte Gruppe (1-2), bestehend aus *Urocystis bulbocodii* und *Urocystis colchici*.

Die große Ranunculaceen-Gruppe (2-1) wird in der Multigenanalyse (Abb.9-12) von *Urocystis anemones*, *Urocystis eranthidis*, *Urocystis ficariae* *Urocystis floccosa*, *Urocystis ranunculi* und *Urocystis pulsatillae* gebildet und bei allen Analysen mit Unterstützungswerten von 96-100 % unterstützt. *Urocystis irregularis* und *Urocystis syncocca* bilden eine weitere Gruppe (2-2), welche in allen Analysen eine sehr gute Absicherung von 96-100 % aufweist. Sie wird meist als Schwestergruppe der Gruppe 2-1 platziert. Dies ist jedoch nicht durch Unterstützungswerte abgesichert. Ein weiterer Vertreter auf den Ranunculaceen, *Urocystis trollii*, wird bei allen Analysen (Abb.9-12), jedoch ohne Unterstützung, zu den Gruppen 1-1, 1-2, 1-3 gestellt.

Die Gattung *Vankya*, vertreten durch *Vankya heufleri* und *Vankya ornithogali*, wird bei der Bayesschen Statistik und der Maximum-Parsimony-Analyse nicht eindeutig zugeordnet. Bei der Maximum-Likelihood-Analyse wird die Gattung *Vankya* als Schwestergruppe zu der Monokotyledonen-Gruppe (1-1, 1-2, 1-3 plus *Urocystis trollii*) gestellt. Das Neighbour-Joining-Verfahren (Abb.10) stellt diese jedoch ohne *Urocystis trollii* als Schwestergruppe zu Gruppe 2. All diese Platzierungen sind wiederum nicht hinreichend unterstützt.

Urocystis primulae gruppiert bei allen Multigen-Analysen (Abb.9-12) zusammen mit *Ustacystis waldsteiniae*, mit Unterstützungswerten zwischen 64 und 85 %. Die Stellung dieser Gruppe reicht von einer Schwestergruppe zu den anderen bei der Bayesschen Statistik und Maximum-Likelihood (Abb. MG01+02) über sehr basal zu den meisten anderen Arten bei Neighbour-Joining (Abb.10) bis zu nicht aufgelöst bei Maximum-Parsimony (Abb.9).

Urocystis trientalis wird bei Maximum-Likelihood und Neighbour-Joining (Abb.10+11) in die Nähe zum Komplex aus Gruppe 2-1 und 2-2 gestellt, ohne dass diese Stellung ausreichende Unterstützungswerte erhält.

Die Stellung von *Flamingomyces ruppiae* (Abb.9-12) ist ebenfalls schlecht aufgelöst und steht in der Neighbour-Joining-Analyse (Abb.10) als Schwestertaxon zum *Vankya* – *Urocystis alstroemeria* Komplex, wenn auch nicht unterstützt. Bei den anderen Analysen ist die Stellung von *Flamingomyces ruppiae* isoliert (Abb.9, 11+12).

Auch die Stellung von *Mundkurella kalopanacis* wird nicht aufgelöst und je nach Analyseverfahren sehr verschieden platziert. Während diese Art bei der Bayesschen Analyse lediglich in eine Gruppe platziert wird, die ohnehin fast alle beinhaltet (Abb.12), wird sie bei Maximum-Likelihood (Abb.11) zusammen mit *Urocystis galanthi*, nicht signifikant, zu Gruppe 1 gesetzt. Neighbour-Joining und Maximum-Parsimony platzieren *Mundkurella* als Schwestertaxon zu den anderen Arten.

4.2.3 Ergebnisse der ITS-Analysen

Das für die ITS-Analyse verwendete Alignment enthält 40 verschiedene Sequenzen und weist nach der Alignment mit MAFFT eine Länge von 740 bp auf. 450 der Positionen sind konserviert, 254 variabel und 120 parsimony-informativ.

Im Wesentlichen werden in der ITS-Analyse (Abb.13-15) mit allen Analyseverfahren die gleichen abgesicherten, oben bereits beschriebenen Gruppen, also 1-1, 1-2, 1-3, 2-1 und 2-2 rekonstruiert, die sich auch in den Multigenanalysen zeigen. Die Aufteilung der Gruppe 1-1, welche bei einigen Multigen-Analysen zu erkennen waren, finden sich auch hier zum Teil wieder. So ist bei allen vier Analysen eine recht gut unterstützte Gruppe, mit Unterstützungswerten von 85 bis 100 %, aus *Urocystis triseti*, *Urocystis ulei*, *Urocystis agropyri* und *Urocystis bromi* zu erkennen. Anders als in der Multigen-Analyse mit der Bayesschen Statistik, bei der *Urocystis primulae* zusammen mit *Ustacystis* die Schwestergruppe zu den übrigen darstellt (Abb.12), ist *Urocystis primulae* in der ITS-Analyse (Abb.13-15) bei der Bayesschen Statistik und Maximum-Likelihood zusammen mit *Ustacystis* und *Melanustilospora* zusammen gruppiert (Abb.14-15).

its
NJ
BS 1000

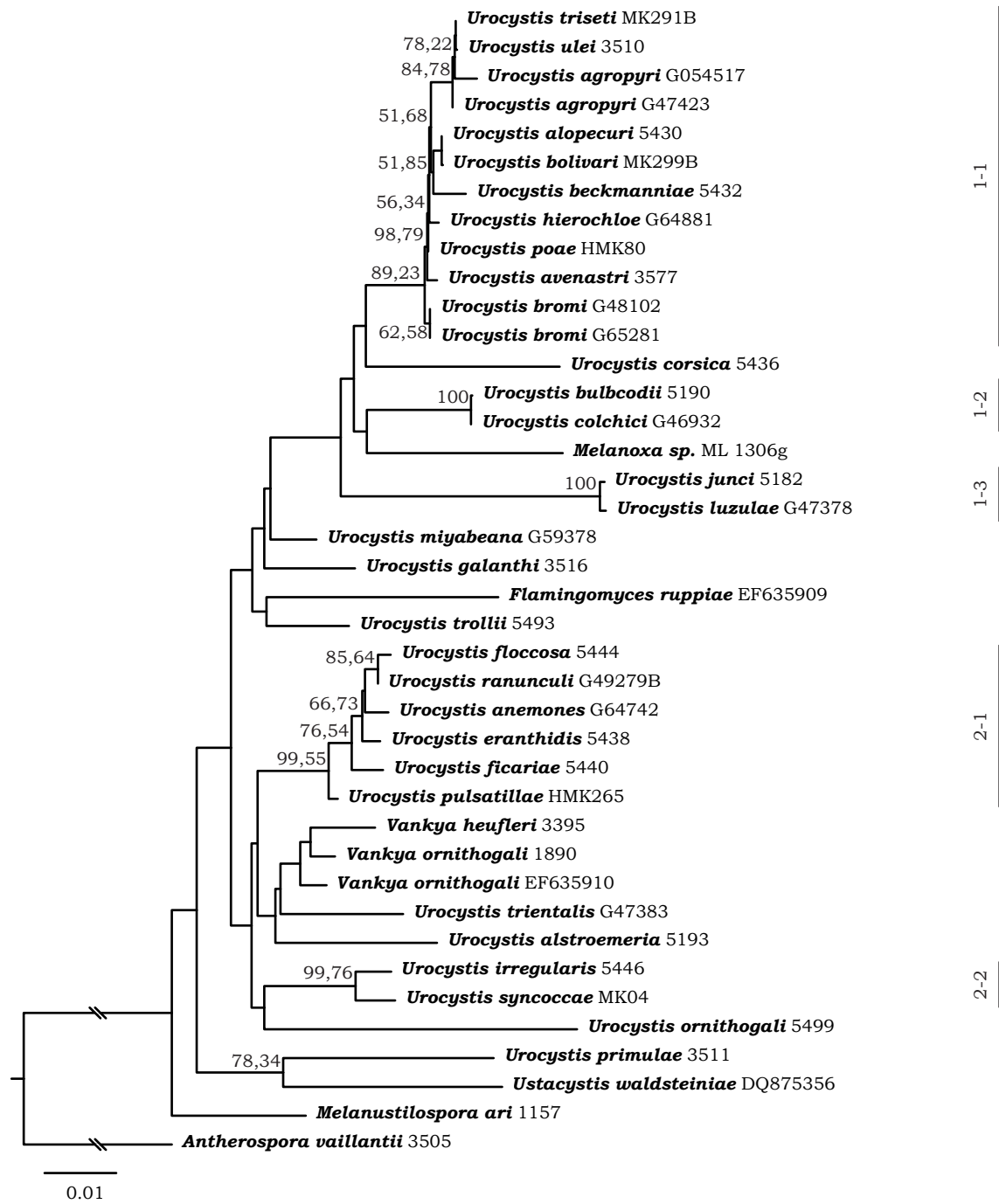


Abb. 13: Neighbour-Joining-Analyse der ITS-Region, BS>50 sind angegeben

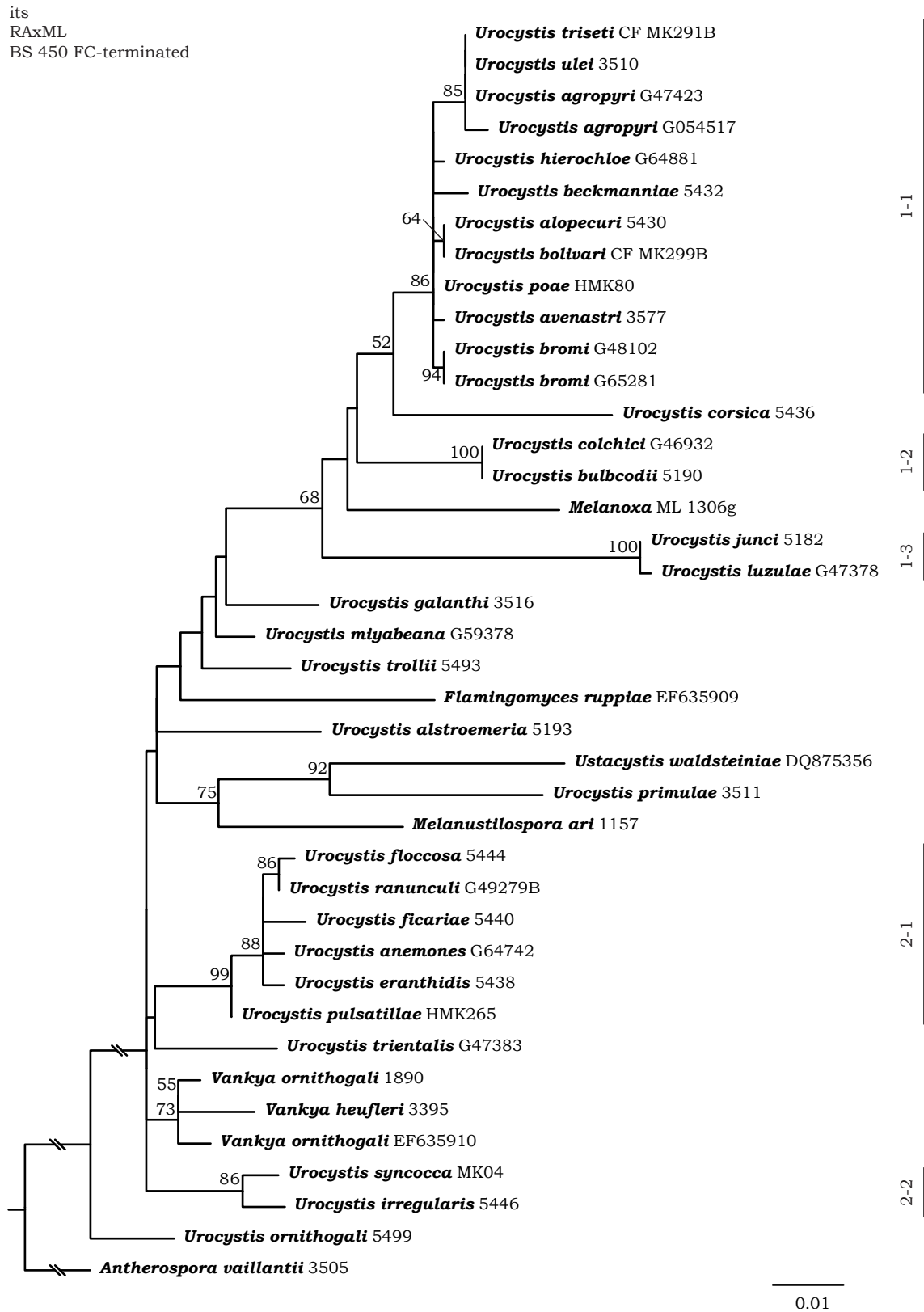


Abb. 14: Maximum-Likelihood-Analyse der ITS-Analyse, BS>50 sind angegeben

its
MrBayes
4.000.000 Generationen

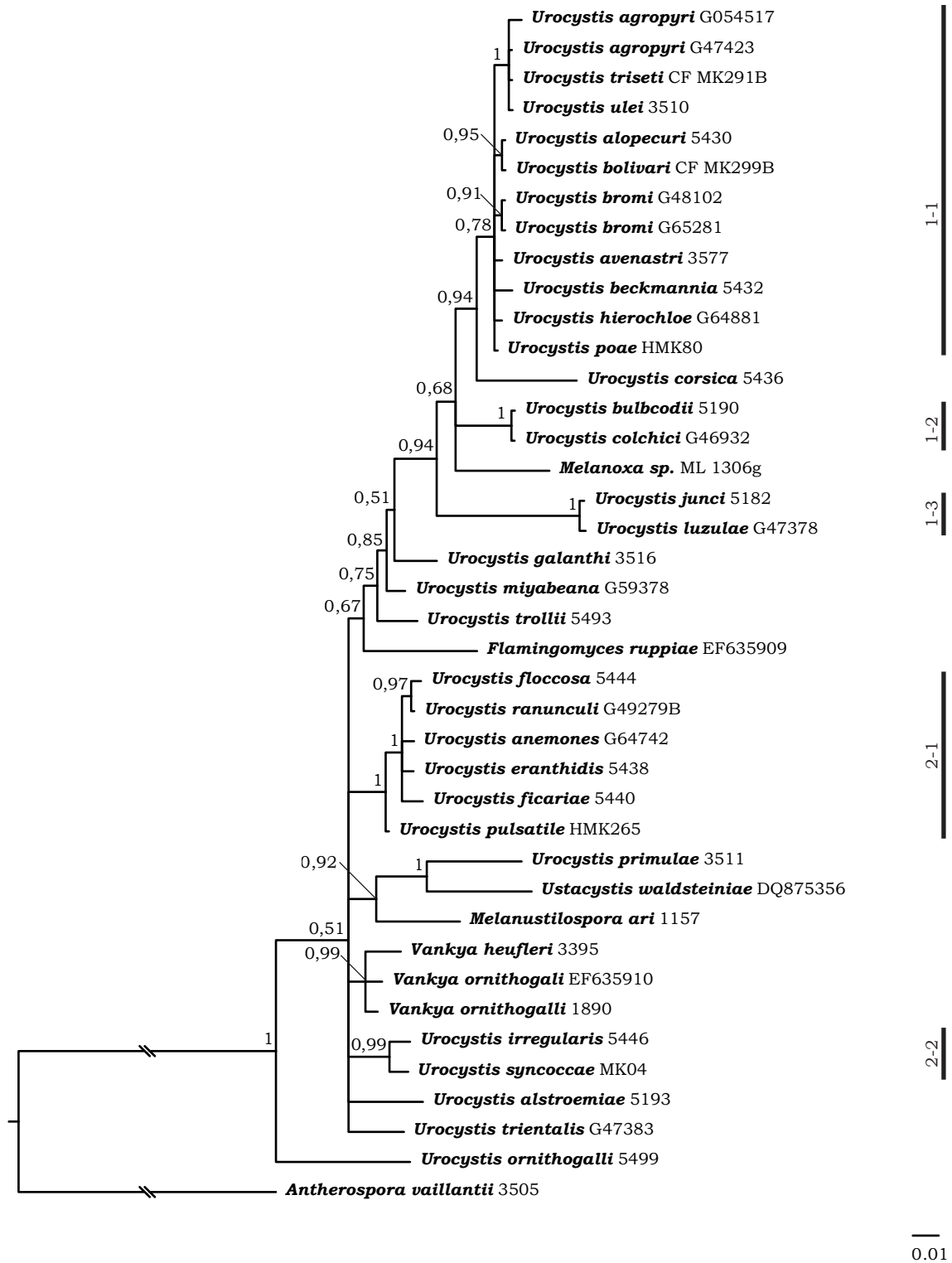


Abb. 15: Bayessche Analyse der ITS-Region, $pp > 50$ sind angegeben

Die Stellung von diesem Komplex wird jedoch nicht richtig aufgelöst. In der Neighbour-Joining-Analyse steht dieser Komplex hingegen isoliert als Schwestergruppe zu den anderen (Abb.13).

Gruppe 1-2 und 1-3 werden in allen Fällen zu 100 % unterstützt und sind wie bei der Multigen-Analyse (Abb.12) positioniert. Auch hier findet sich in allen Fällen die Gattung *Melanoxa* zwischen diesen Gruppen. Des Weiteren sind die Gruppen 2-1 und 2-2 unverändert. Wie in der Multigen-Analyse findet sich in Gruppe 2-1 *Urocystis pulsati-lae* wieder basal und die Gruppe 2-2 wieder getrennt von der anderen (Abb.13-15).

Die Stellung von *Melanustilospora ari* variiert bei den verschiedenen Analysen. Wird diese Art bei Neighbour-Joining (Abb.13) als Schwestertaxon zu den anderen aufgestellt, wird sie bei der Bayesschen Statistik und Maximum-Likelihood-Analyse (Abb.14+15) zusammen mit *Urocystis primulae* und *Ustacystis waldsteiniae* gefasst und an verschiedenen Stellen mit zu den anderen Arten .

Die Gattung *Vankya* ist hier, wie bei der Multigen-Analyse (Abb.12), wieder zusammen gruppiert, und bildet eine monophyletische Gruppe, welche aber aufgrund der polytomen Aufteilung bei der Bayesschen Statistik (Abb.15) bzw. der schlechten Auflösung bei der Maximum-Likelihood-Analyse (Abb.14) nicht weiter aufgelöst wird. Bei Neighbour-Joining (Abb.13) findet sich diese Gruppe hingegen mitten bei den Dikotyledonen. *Urocystis trollii*, *Urocystis miyabeana* und *Urocystis galanthi* werden ähnlich platziert, mit genauso wenig Unterstützung wie bei der Multigen-Analyse.

Flamingomyces hingegen wird hier in der ITS-Analyse bei der Monokotyledonen-Gruppe aufgestellt, wofür sich jedoch nur bei der Bayesschen Statistik (Abb.15) ein Unterstützungswert von 67 % findet.

Urocystis alstroemeria wird in der Polytomie bei der Bayesschen Analyse nicht aufgelöst und bei den anderen Methoden unterschiedlich platziert.

4.2.4 Ergebnisse der LSU-Analysen

Das für die LSU-Analyse verwendete Alignment enthält 40 verschiedene Sequenzen und weist nach der Alignierung mit Mafft eine Länge von 675 bp auf. 486 der Positionen sind konserviert, 150 variabel und 46 parsimony-informativ.

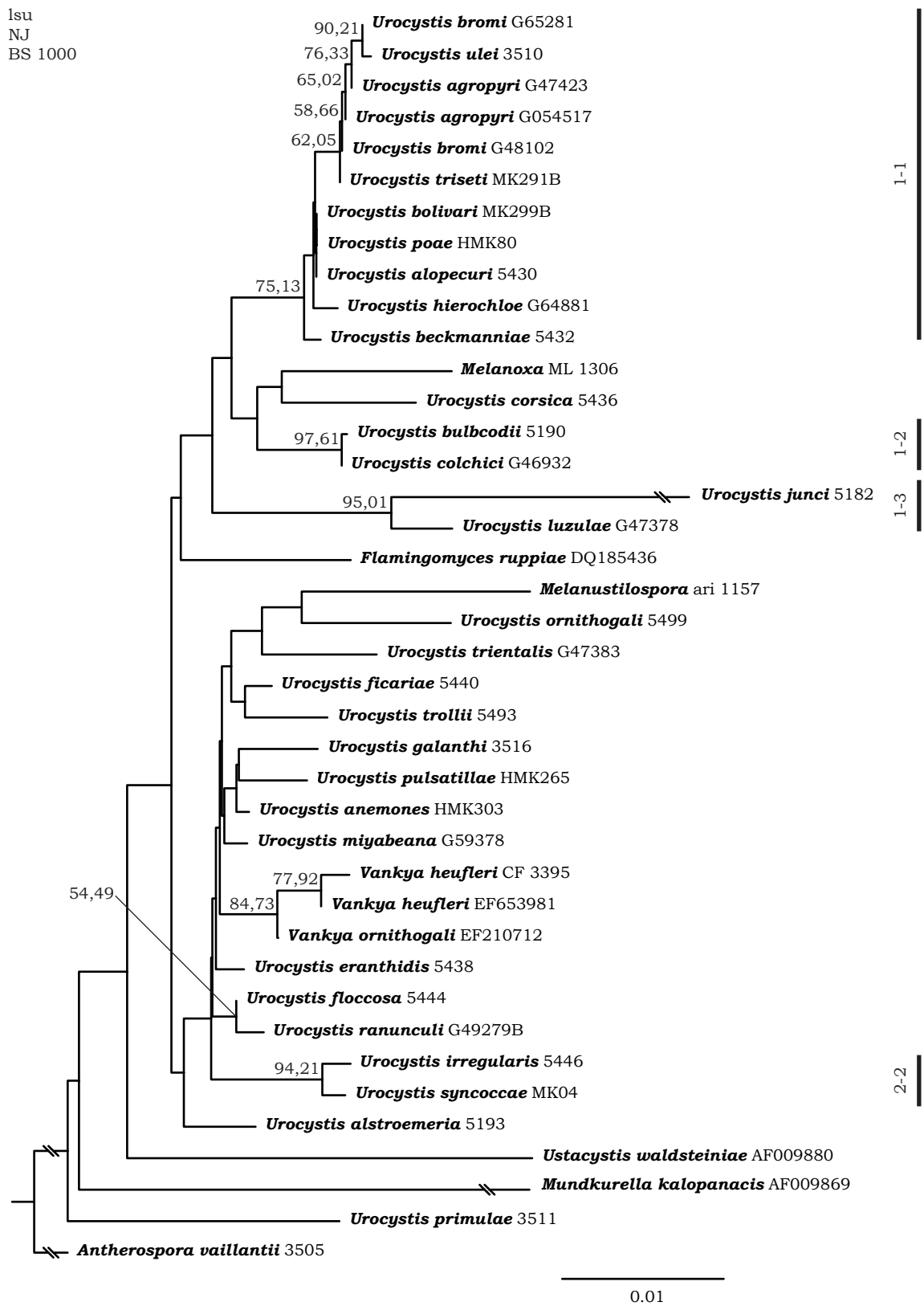


Abb. 16: Neighbour-Joining-Analyse der LSU-Region, BS>50 sind angegeben

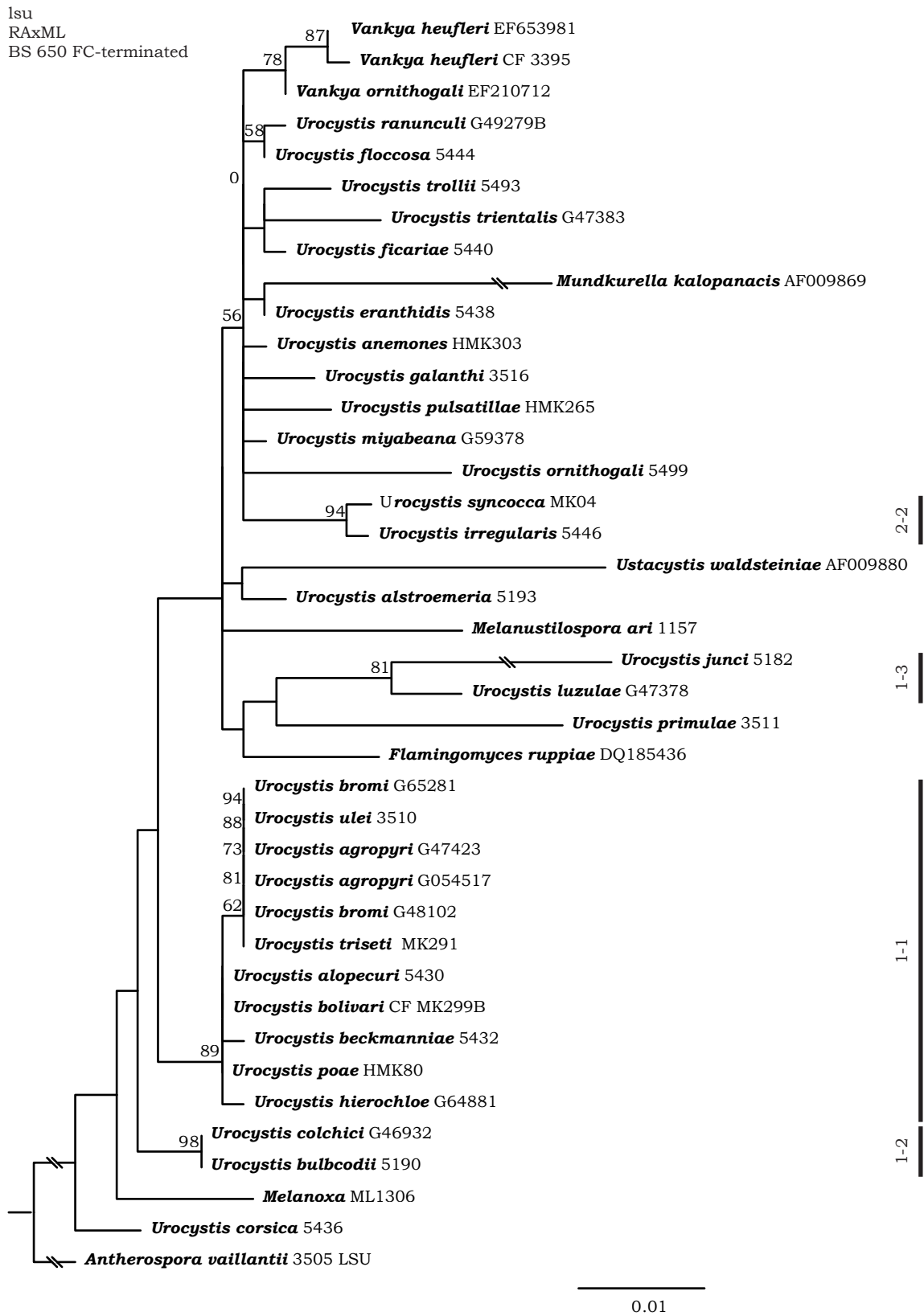


Abb. 17: Maximum-Parsimony-Analyse der LSU-Region, BS>50 sind angegeben

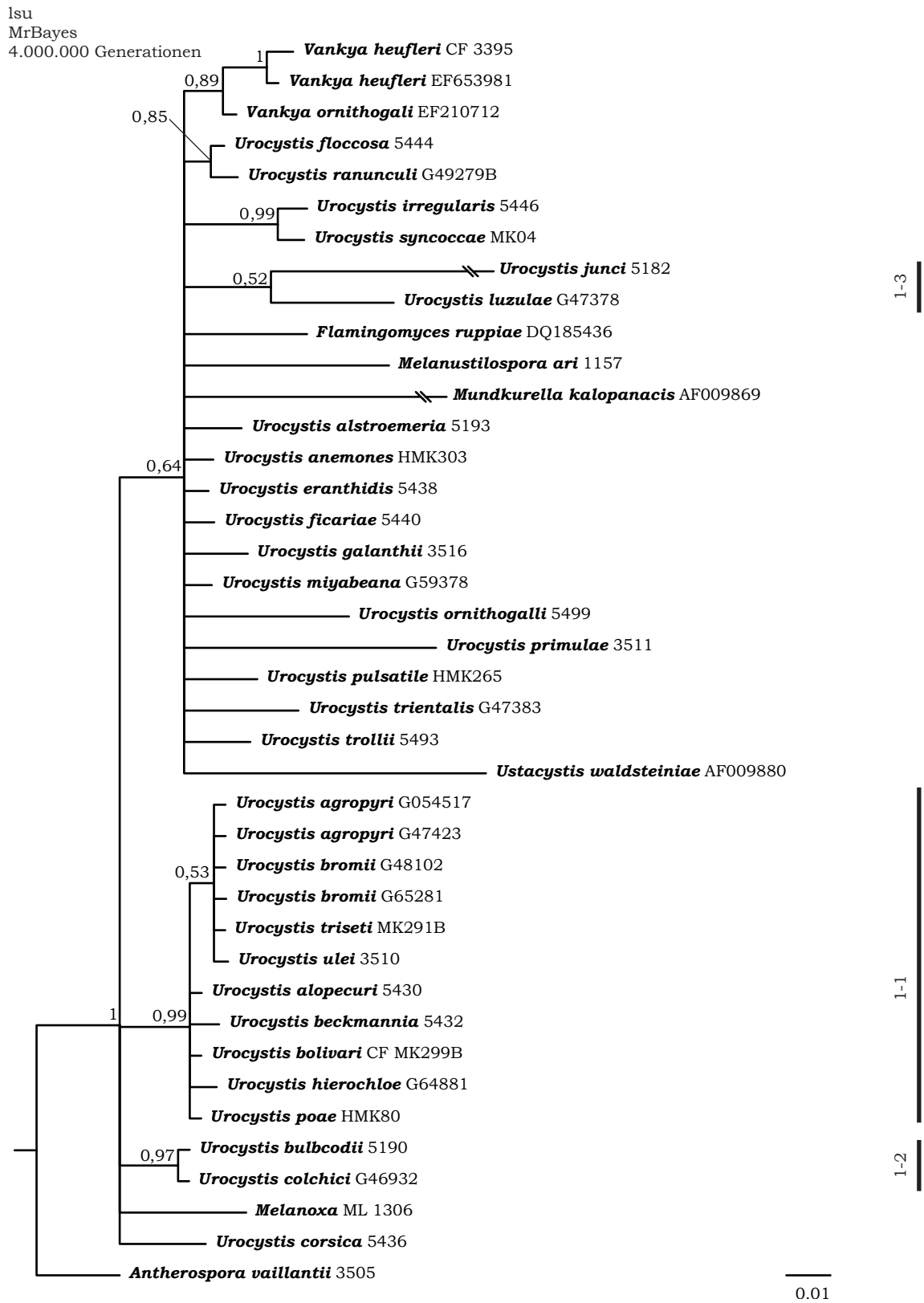


Abb. 18: Bayessche Analyse der LSU-Region, $pp > 50$ sind angegeben

Die LSU-Analysen (Abb.16-18), besonders bei der Bayesschen Statistik und Neighbour-Joining (Abb.16+18) sind von Polytomien gekennzeichnet, respektive schlecht aufgelöst, und unterscheiden sich wesentlich von den anderen Analysen. Obwohl der Neighbour-Joining-Baum dichotom aufgeschlüsselt ist (Abb.16) fehlt es an den meisten Verzweigungen an den statistisch signifikanten Unterstützungswerten.

Ausgeprägt ist jedoch die sehr gute bis gute Unterstützung der Gruppe 1-1, vor allem bei der Bayesschen Statistik und Maximum-Likelihood (Abb.17+18). Bei Neighbour-Joining (Abb.16) liegt die Unterstützung bei 75 %. Die Gruppe 1-2 wird, wie in den vorhergegangenen Analysen, mit Unterstützungswerten von über 95 % unterstützt. Gruppe 1-3 wird hier kaum unterstützt. So hat diese Gruppe bei der Bayesschen Statistik (Abb.18) lediglich eine Unterstützung von 0,52 (entsprechend 52 %), bei Maximum-Likelihood und Neighbour-Joining hingegen bei 81 und 95 %. Gruppe 2-1 wird hier bei keiner der verwendeten Analysemethoden unterstützt. Lediglich *Urocystis floccosa* und *Urocystis ranunculi* werden, wenn auch nicht gut unterstützt, zusammen gruppiert. Die restlichen Vertreter sind polytom zueinander angeordnet.

Bei den Bayesschen-, Maximum-Likelihood- und Neighbour-Joining-Analysen (Abb.16-18) sind in allen Fällen zwei Großgruppen zu erkennen, die jedoch nicht gleich besetzt sind. Bei der Bayesschen Statistik und Maximum-Likelihood wird in einer Gruppe alles zusammengefasst, was nicht zu Gruppe 1-1 und 1-2 gehört, sowie *Urocystis corsica* und *Melanoxa*. Die Gruppierung in der Neighbour-Joining-Analyse lehnt sich an die bekannte Gruppierung aus der Bayesschen Statistik an (Abb. MB ...)

4.2.5 Ergebnisse der TEF1alpha-Analysen

Das für die TEF1-Analyse verwendete Alignment enthält 32 verschiedene Sequenzen, (TAB XYZ), und weist nach der Alignierung mit Mafft eine Länge von 677 bp auf. 488 der Positionen sind konserviert, 187 variabel und 109 parsimony-informativ.

Die TEF1-Analyse (Abb. 19-22) zeigt die beste Auflösung, im Vergleich zu den ITS-, LSU- und Multigen-Analysen, was an den recht langen internen Astlängen zuerkennen ist. Für viele Knoten sind hohe signifikante Unterstützungswerte zu erkennen.

Bis auf wenige Ausnahmen ist die Topologie bei der TEF1-Analyse identisch mit der von Multigen- und ITS-Analyse.

tef
MP
BS 1000

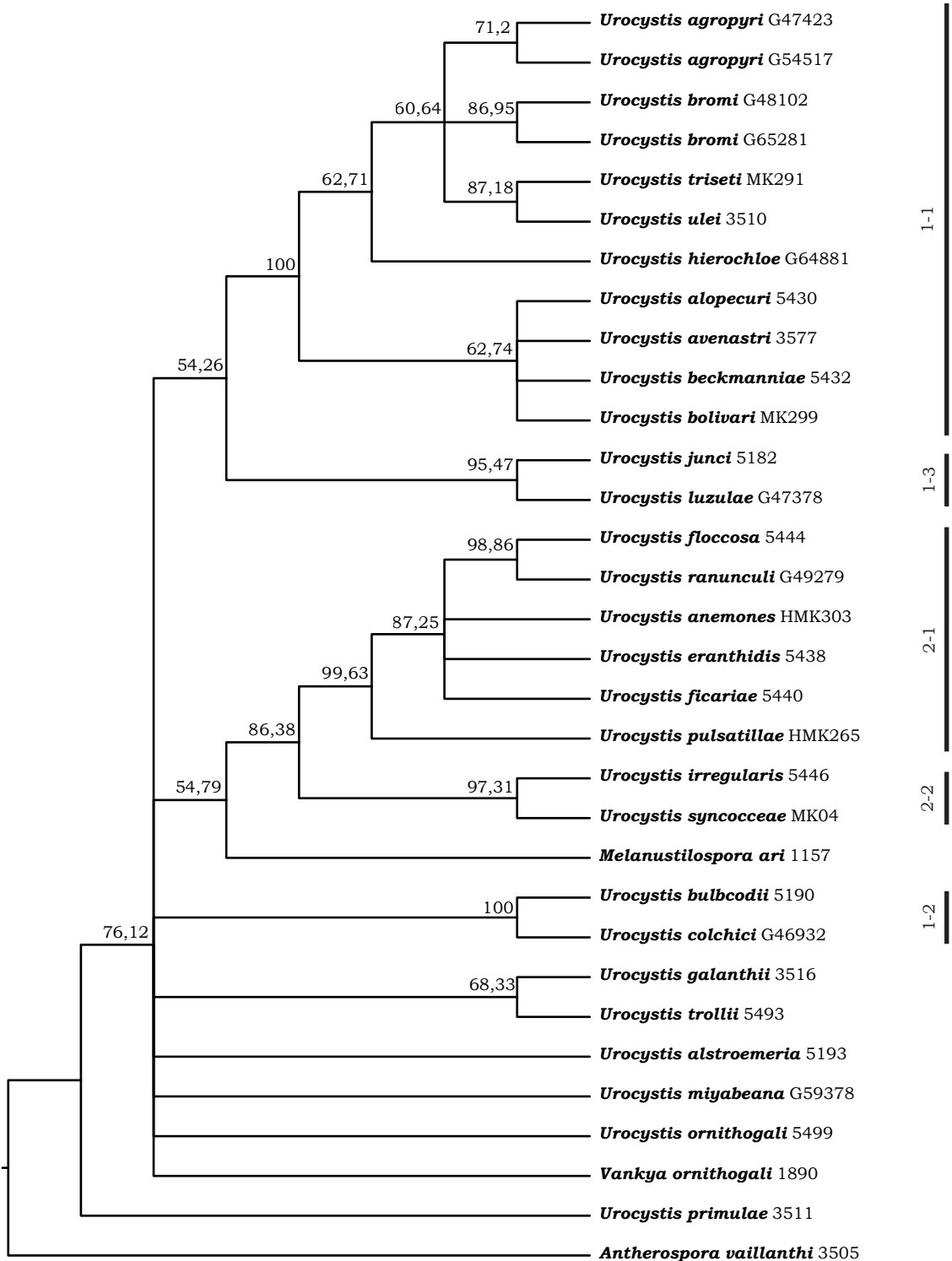


Abb. 19: Maximum-Parsimony-Analyse der TEF1-Region, BS>50 sind angegeben

tef
 NJ
 BS 1000

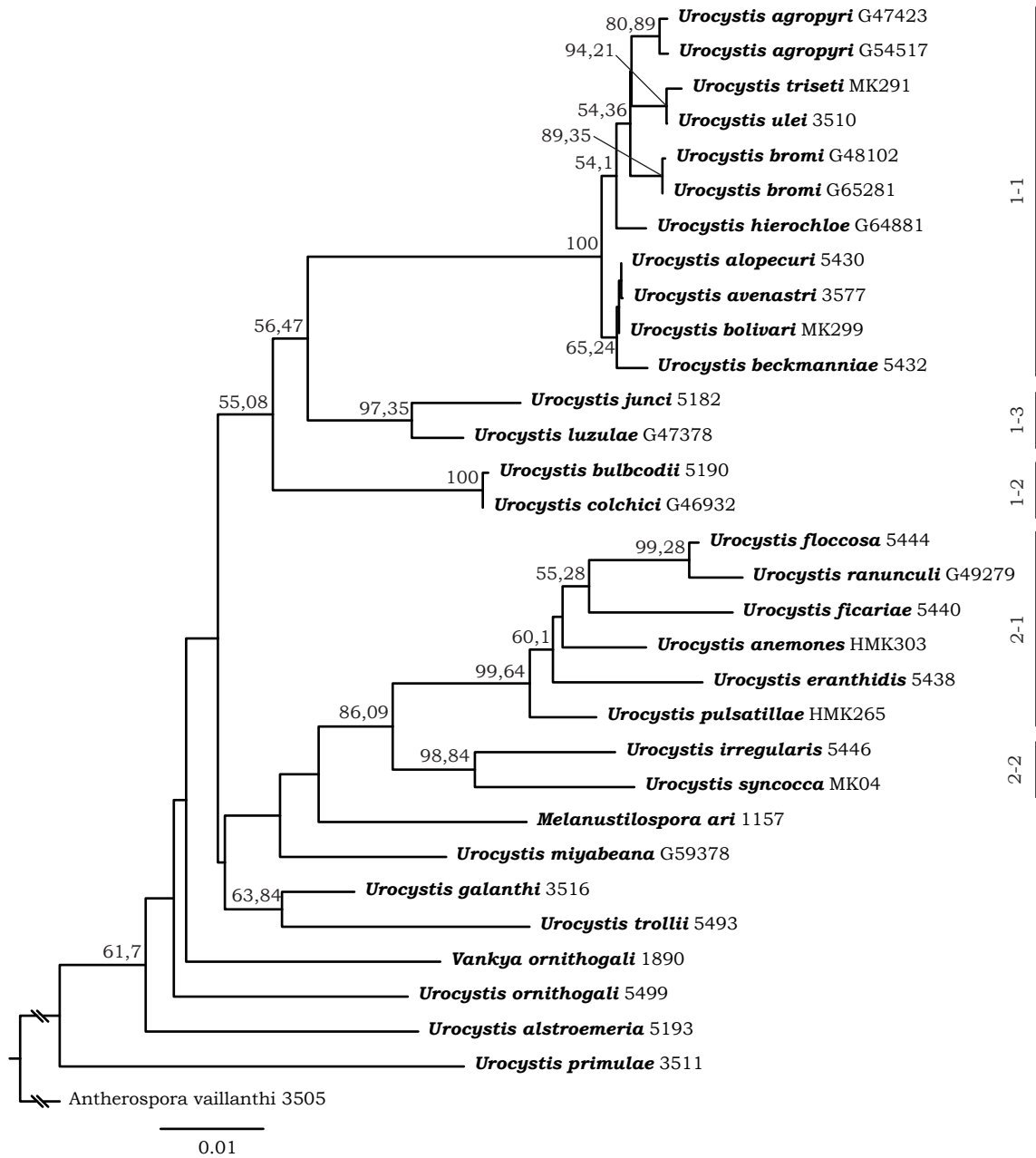


Abb. 20: Neighbour-Joining-Analyse der TEF1-Region, BS>50 sind angegeben

tef
RAxML
BS 300 FC-terminated

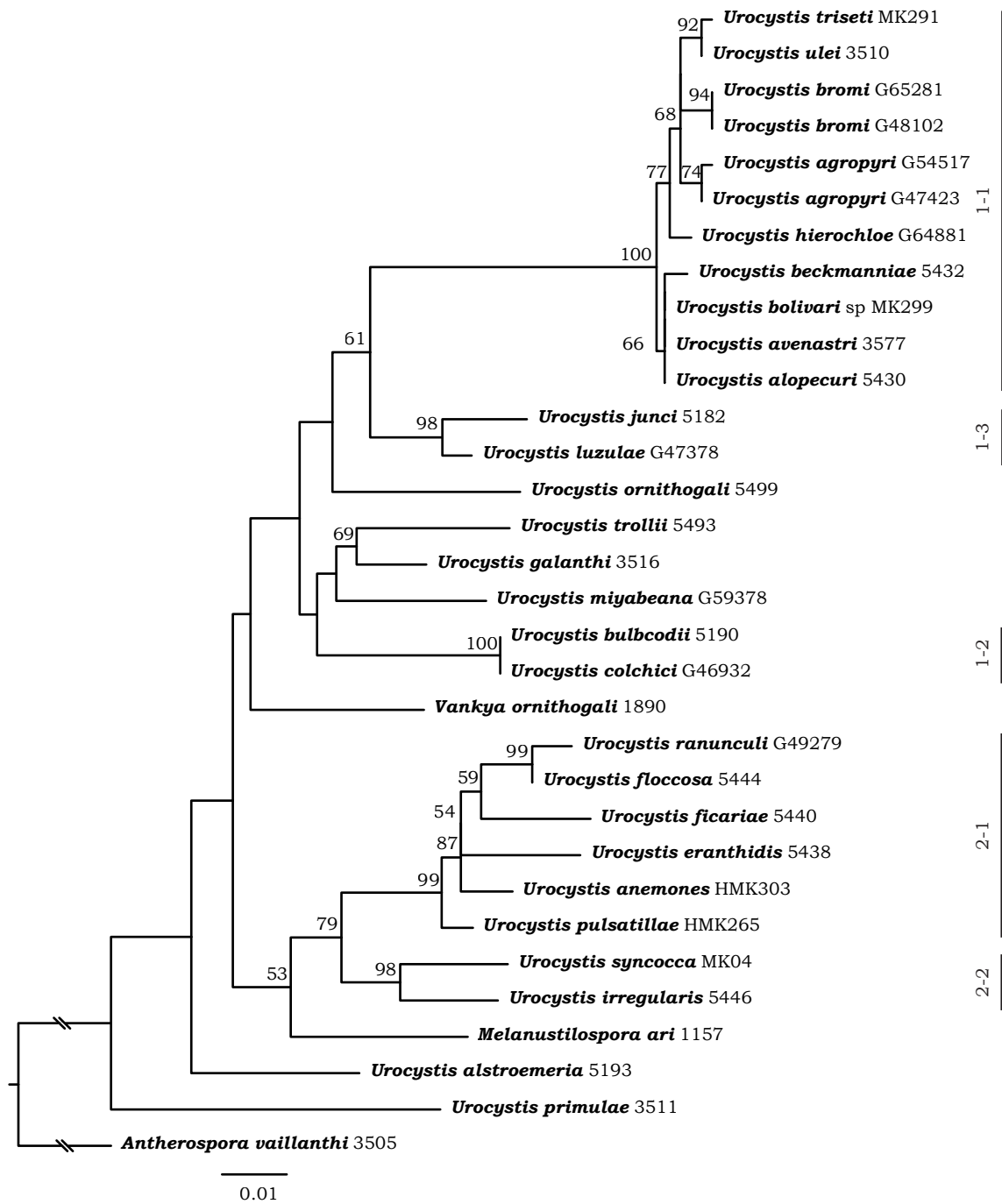


Abb. 21: Maximum-Likelihood-Analyse der TEF1-Gen-Region, BS>50 sind angegeben

tef
MrBayes
5.000.000 Generationen

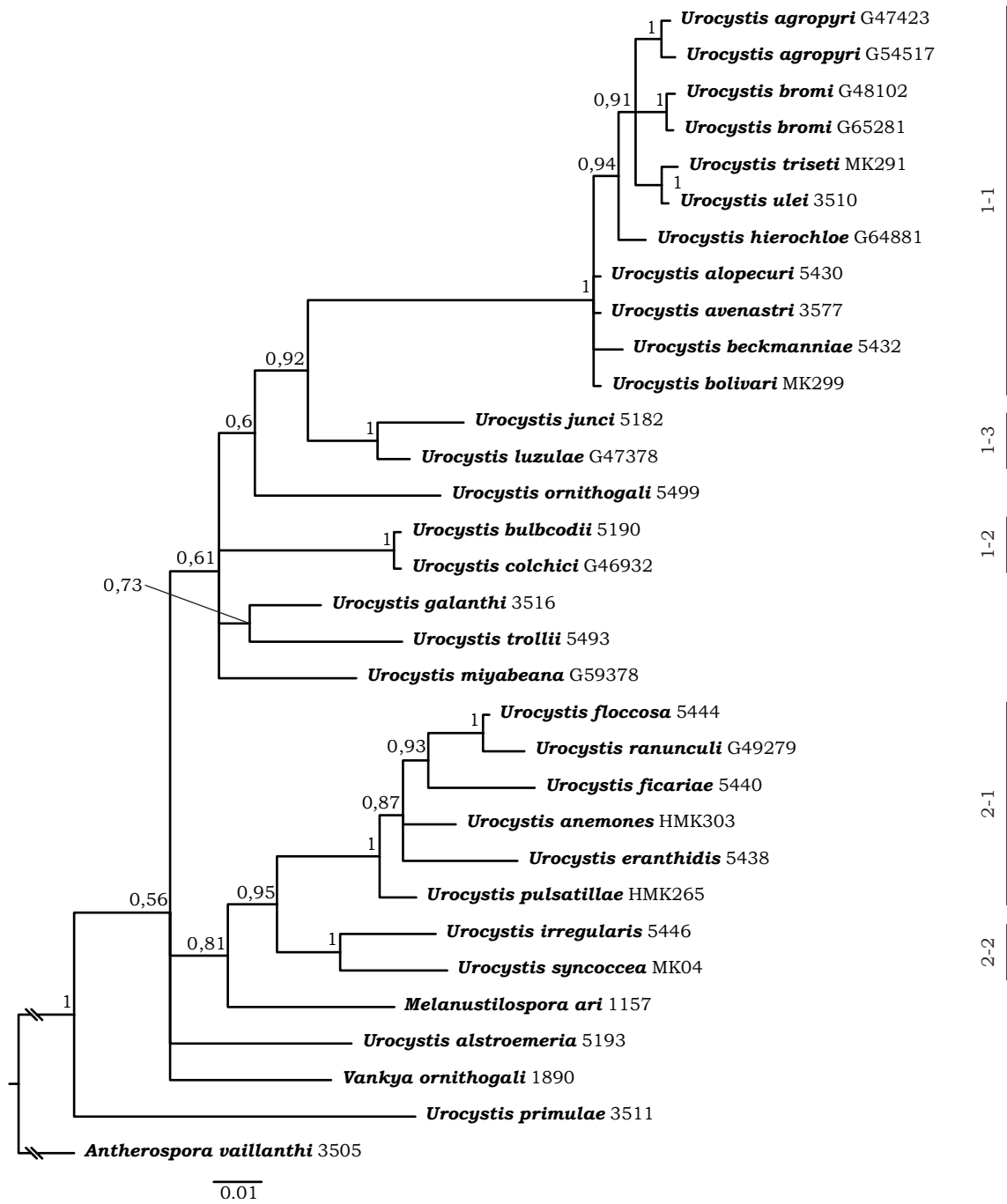


Abb. 22: Bayessche Analyse der TEF1-Gen-Region, $pp > 50$ sind angegeben

Die bereits bekannten Gruppen 1-1, 1-2 und 1-3 finden sich auch hier mit sehr guten Unterstützungswerten wieder (Abb.19-22). Auch die Gruppen 2-1 und 2-2 sind hier mit sehr guten Unterstützungswerten vertreten, werden aber, anders als bei den vorhergegangenen Analysen, zu einem zusammenhängenden, gut unterstützten Komplex gruppiert (Abb.19-22). Wie bereits bei anderen Bäumen wird *Urocystis trollii* nicht zu den anderen Ranunculaceen-Parasiten platziert, sondern zusammen mit *Urocystis galanthi* gruppiert. Weiter ist auffällig, dass in allen Untersuchungen *Urocystis primulae* (Abb.19-22) als Schwestertaxon zu den anderen Arten gestellt wird. Dies ist bei den anderen Analysen nicht immer der Fall.

4.3 Ergebnisse Morphologie

Anhand der Daten aus früheren Publikationen (Vánky 1994; Vánky 2001) ist zu erkennen, dass die Anzahl an fertilen Sporen pro Sporenballen je nach Art zwischen eins und fünfzig variiert. Die meisten in dieser Arbeit untersuchten *Urocystis*-Arten weisen 1-3 fertile Sporen pro Ballen auf (Tab.9). Die einzige Art mit sehr vielen fertilen Sporen ist *Urocystis trientalis*, bei der bis zu 50 fertile Sporen pro Sporenballen nachgewiesen werden konnten ((Vánky 1994). Anhand dieser Daten wurden die Sporen in sechs Kategorien (Tab.9) aufgeteilt, wobei die ersten drei Kategorien häufig anzutreffende Sporenverteilungen sind, während die drei letzten die gefundenen Extreme darstellen:

Tab.9: anhand der morphologischen Daten entwickelten Sporenkategorien

Anzahl fertiler Sporen/Ballen (Min. – Max.)	Sporenkategorie:
1-3	1
1-6	2
1-9	3
1-20	4
3-15	5
6-50	6

Mit diesem System lassen sich die *Urocystis*-Arten anhand der Sporenmorphologie kategorisieren (Tab.10)

Tab. 10: Zuordnung der *Urocystis*-Arten in die Sporenkategorien

Urocystis	fertile Sporen	Sporen-Kat
<i>Urocystis agropyri</i>	1-3(-5)	1
<i>Urocystis alopecuri</i>	1-3	1
<i>Urocystis avenastri</i>	1-4(-5)	2
<i>Urocystis beckmannia</i>	1-2(-3)	1
<i>Urocystis bolivari</i>	1-6	2
<i>Urocystis bromi</i>	1-4	2
<i>Urocystis hierochloe</i>	1-4(-5)	2
<i>Urocystis poae</i>	1-2(-4)	1
<i>Urocystis triseti</i>	1-6	2
<i>Urocystis ulei</i>	1-2(-3)	1
<i>Urocystis bulbcodii</i>	1-5(-9)	2
<i>Urocystis colchici</i>	1-3(-4)	1
<i>Urocystis junci</i>	1-20	4
<i>Urocystis luzulae</i>	1-7(-12)	3
<i>Urocystis anemomes</i>	1-3	1
<i>Urocystis eranthidis</i>	1-2(-3)	1
<i>Urocystis ficariae</i>	1-3(-4)	1
<i>Urocystis floccosa</i>	1-3(-4)	1
<i>Urocystis pulsatile</i>	1-5	2
<i>Urocystis ranunculi</i>	1-3(-5)	1
<i>Urocystis irregularis</i>	1-7(-9)	3
<i>Urocystis syncocca</i>	1-8(-9)	3
<i>Urocystis corsica</i>	(3-)6-15(-20?)	4
<i>Urocystis ornithogalli</i>	1-3(4)	1
<i>Urocystis alstroemeria</i>	(0-)1-4(-6)	2
<i>Urocystis miyabeana</i>	1-3(-4)	1
<i>Urocystis galanthii</i>	1-3(-4)	1
<i>Urocystis trollii</i>	(1-)2-5(-8)	2
<i>Urocystis trientalis</i>	6-50	6
<i>Urocystis primulae</i>	(1-)3-15	5
<i>Urocystis occulta</i>	1-3(-5)	1
<i>Urocystis orobanches</i>	1-2(-3)	1

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Phylogenie der Brandpilzgattung *Urocystis* zum ersten Mal im größeren Maßstab untersucht und ausgewertet. Für die Erstellung der finalen phylogenetischen Analysen sind Sequenzen der ITS-rDNA, LSU-rDNA und TEF1-Region eingeflossen und mit den phylogenetischen Analysemethoden Maximum-Parsimony, Neighbour-Joining, Maximum-Likelihood und Bayessche Statistik (Abb.9-22) untersucht worden. Die dabei erzeugten Daten lassen einen neuen Blick auf die Gattung *Urocystis* zu, und zeigen die Stärken und Schwächen der einzelnen Bearbeitungsschritte für diese Fragestellung auf. Diese sollen hier, beginnend bei der DNA-Isolation über die Amplifikation bis zu den phylogenetischen Rekonstruktionen diskutiert werden. Ein besonderer Fokus liegt auf der Frage nach der Phylogenie der Gattung *Urocystis* und deren Unterstützung mittels morphologischer Daten. Dabei ist dann vom weiterem Interesse, ob Wirt und Parasit gemeinsam evolvierten.

5.1 Anmerkung zu den DNA-Isolationen

Eine erfolgreiche DNA-Isolation ist nicht für alle bearbeiteten Belege nachgewiesen worden, was verschiedene Gründe haben kann. So konnten zwar in anderen Arbeiten aus bis zu etwa 130 Jahre alten Herbarbelegen mit DNA-Isolutions-Kits erfolgreich Pflanzen-DNA isoliert werden (Telle 2008), jedoch hat sich die DNA-Isolierung aus alten Herbarbelegen für die vorliegende Arbeit als schwierig erwiesen. Erschwerend kommt hinzu, dass die zur Verfügung stehende Sporenmenge im Verhältnis zum Pflanzenmaterial gewichtsmäßig eher gering einzustufen ist, im Vergleich mit der oben genannten Studie. Diese Schwierigkeit ergab sich, neben anderen, auch bei dem Beleg von

Urocystis occulta aus dem Jahre 1934 (Anhang 5), bei dem keine erfolgreiche Amplifikation der isolierten DNA möglich war. Dies ist umso bedauerlicher, als dass es sich bei *Urocystis occulta* um die Typusart für die Gattung *Urocystis* handelt (Vánky 1994), welche somit nicht in die phylogenetischen Untersuchungen mit eingehen konnte. Auch bei den Arten *Urocystis filipendulae* und *Urocystis kmetiana*, welche von K. Vánky als Exsikkate zur Verfügung gestellt wurden, konnte die DNA nicht erfolgreich amplifiziert werden. Dies ist besonders bedauerlich für *Urocystis filipendulae*, die auf der *Filipendula ulmaria* parasitiert, da diese Sequenz die Einzige in dieser Arbeit von einer Rosaceen-parasitierenden Art gewesen wäre, und somit eventuell einen Blick auf deren phylogenetische Stellung gegeben hätte. Von den anderen Arten waren hingegen genug Belege vorhanden, um von mindestens einem Vertreter pro Art die DNA isolieren zu können. Damit war es möglich, gut ein Viertel der weltweit bekannten *Urocystis*-Arten in dieser Arbeit zu behandeln.

5.2 Gen-Marker

Im Rahmen dieser Arbeit sind für verschiedene Gen-Regionen verschiedene Primer getestet worden. Sowohl aufgrund langjähriger guter Erfahrungen bei einigen Primern, vor allem für die LSU-Region (Begerow, Bauer & Oberwinkler 1997; Begerow, Bauer & Boekhout 2000), wie aus ökonomischen Gründen wurde im Wesentlichen auf die Primer zurückgegriffen, die bereits im Labor Verwendung finden. Von den getesteten zehn Gen-Regionen konnten vier regelmäßig erfolgreich amplifiziert werden.

Der Vergleich der Gen-Marker bezieht sich im Wesentlichen auf die drei Marker-Gene: ITS, LSU und TEF1. Auf einen direkten Vergleich dieser drei Marker-Gene zu LBA wird aus verschiedenen Gründen verzichtet. Zum einen ist die LBA-Region nicht für die

phylogenetischen Rekonstruktionen verwendet worden. Zum anderen standen zum Alignieren, aufgrund der Neuartigkeit als genetischer Marker, keine passenden Außengruppen zur Verfügung. Zum Zeitpunkt der Testphase von LBA war lediglich eine LBA-Sequenz, von *Ustilago maydis*, bei der GenBank hinterlegt. Diese wurde als Außengruppe getestet, was jedoch zur Folge hatte, dass das erstellte Alignment Lücken mit einer Größe von bis zu 170bp aufweist (Anhang 6). Auch die phylogenetischen Analysen lassen diese Gen-Region für die Fragestellung bei dieser Arbeit als unbrauchbar erscheinen, da die gewonnene Phylogenie weder gut aufgelöst, noch die Knoten unterstützt sind (Anhang 4). Eine weitere Auswertung zeigt zudem, dass diese Region zu variabel ist. So zeigt das Alignment, ohne *Ustilago maydis*, einen Anteil an konservierten Positionen von 34,8 %, was die statistischen Probleme bei den Unterstützungswerten erklären würde (Bruns, White & Taylor 1991). Diese hohe Variabilität kann weiterhin eine Erklärung dafür sein, dass die PCR-Reaktionen teilweise nicht funktioniert haben.

Der Vergleich der drei anderen DNA-Regionen untereinander zeigt, dass die ITS-Region, wie auch in früheren Arbeiten (White u.a. 1990; Begerow u.a. 2010) am variabelsten ist (Anhang 6). Die LSU-Region zeigt sich in der Auswertung, im Vergleich zur ITS-Region, als relativ konserviert, mit einem ähnlich hohen Anteil an konservierten Positionen wie die TEF1-Region. In beiden Fällen beträgt der Anteil an konservierten Positionen in etwa 72 %. Die Unterschiede zwischen diesen beiden Regionen zeigen zum einen der grafische Vergleich (Anhang 6), zum anderem die Zahl der Parsimony-informativer-Positionen (PIC). Die grafische Darstellung der Alignments (Anhang 6) zeigt deutlich, dass die TEF1-Region recht einfach, unter Eröffnung lediglich einer Lücke, zu alignieren ist. Dies wurde unter anderen bereits von Brandon u.a. (2007) beobachtet und entsprach damit den Erwartungen. Der Vergleich der PIC's zeigt, dass die LSU-Region mit gerade 6,81 % im untersuchten Alignment wesentlich geringer ausfällt

als bei der TEF1-Region mit 16,10 %, was sich auch in den phylogenetischen Rekonstruktionen widerspiegelt. Die Variabilität, die bei der ITS-Region gefunden wurde, zeigt sich besonders in den flankierenden Bereichen der 5.8S-Region (Anhang 6), wie auch schon in anderen Arbeiten beschrieben wurde (Bruns u.a. 1992; Boekhout u.a. 2010; Begerow u.a. 2010). Dieser Umstand wird auch bei der grafischen Darstellung der Alignments (Anhang 6) deutlich, bei der die gut zu erkennende zentrale 5.8S-Region fast homogen erscheint, während die Flanken gekennzeichnet sind durch Lücken und inhomogene Bereiche. Diese Bereiche scheinen hier gruppenspezifisch zu sein, wobei bestimmte Lücken im Wesentlichen bei *Urocystis*-Arten auftreten, die auf Monokotyledonen parasitieren.

Ebenfalls konnten beim Amplifizierungsverhalten Unterschiede ausgemacht werden. So waren die ITS- und LSU-Region für gewöhnlich leicht zu amplifizieren. Dafür verantwortlich dürfte sich die tandemartige Anordnung dieser beiden Gene in der rDNA zeigen (Begerow u.a. 2010; Boekhout u.a. 2010). Die TEF1-Region war dagegen schwierig zu amplifizieren und war bei den meisten Proben nur mittels einer „Nested-PCR“ möglich. Da die TEF1-Region als einfache Kopie im Kerngenom liegt (Brandon, Matheny u.a. 2007), sowie der teils geringen Template-Menge, aufgrund geringer Sporenmenge als Ausgangsmaterial der DNA-Isolation, erscheint dies nicht ungewöhnlich.

Jedoch ist zu bedenken, dass die Methode der „Nested-PCR“ auch den Nachteil mit sich bringt, dass die gewonnenen Amplifikate, und somit in Folge die Sequenzen, kürzer sind.

Neben den vier Gen-Regionen die regelmäßig erfolgreich amplifiziert werden konnten, gab es sechs bei denen dies nicht gelang. Einige der Probleme könnten darauf zurückzuführen sein, dass häufig wenig Sporenmaterial zur Verfügung stand, und somit auch die Ausbeute bei der DNA-Isolation entsprechend gering war. Ein Umstand, der noch da-

durch verstärkt wird, dass die Sporenballen der Gattung *Urocystis* größtenteils von einer größeren Menge steriler Zellen umgeben sind. Weiter spielt mit Sicherheit eine Rolle, dass viele dieser Gen-Regionen lediglich in einfacher bis geringer Kopiezahl im Genom vorkommen.

Dieses Problem könnte auch für die Gen-Regionen ATP6 und COX3 zutreffen, die beide im mitochondrialen Genom lokalisiert sind. Eukaryotenzellen weisen zwar in der Regel von mehreren bis zu über tausend Mitochondrien auf, dennoch macht die mtDNA weniger als 0,1 % der Gesamt-DNA aus (Knippers 2001). Allerdings korreliert die Anzahl der Mitochondrien mit dem Energiebedarf der Zelle (Rosen u.a. 1974; Wehner, Gehring & Kühn 1995), sodass zu erwarten ist, dass in den Pilzsporen zunächst weniger Mitochondrien vorhanden sind. Dies scheint auch durchaus der Fall zu sein, zumindest in den Phasen vor der Keimung. So finden sich bei *Mucor rouxii* in den Sporen sechs bis neun Mitochondrien (Bartnicki-Garcia, Nelson & Cota-Robles 1968), bei *Blastiotachiella* sogar nur eine (Cantino u.a. 1963). Der oben erläuterte geringe Mitochondrienanteil dürfte zur Folge, dass die mtDNA in den Sporen selbst in geringer Kopienzahl vorkommt.

Die Schwierigkeiten bei den verwendeten ATP6-Primern können jedoch auch darin begründet sein, dass diese noch nicht ausgereift sind und somit bei den untersuchten Objekten einfach nicht binden konnten (Binder & Hibbett 2003). Anders verhält es sich bei den COX3-Primern, die bereits erfolgreich für die phylogenetische Rekonstruktion der *Boletales*, die ebenfalls zu den Basidiomycota gehören, eingesetzt wurden (Kretzer & Bruns 1999). Wobei sich anscheinend auch dort Schwierigkeiten ergaben, so dass dieser Ansatz bei der phylogenetischen Rekonstruktion der *Boletales* nicht weiter vertieft wurde (Kretzer & Bruns 1999).

Die Gen-Regionen für β -TUBULIN, RPB1 und RPB2 liegen in einfacher Kopie im Kerngenom. Hier waren die Amplifikationen nicht erfolgreich. Die TEF1-Region liegt zwar auch im Kerngenom, hier war die Amplifikation trotz Schwierigkeiten dessen ungeachtet möglich. Alle Primer, die für die β -TUBULIN-Region zum Einsatz kamen, sollten eigentlich basidiomycetenspezifisch sein, sind jedoch nach deren Entwicklung im Wesentlichen für Rostpilze verwendet worden (van der Merwe u.a. 2007). Auch bei dieser Verwendung der Primer scheint die Amplifizierung der β -TUBULIN-Region bei Akazien-Rostpilzen schwierig zu sein (persönliche Kommunikation M. Ebbinghaus).

Eine leichte Amplifizierbarkeit der RPB2-Region (Liu, Hodson & Hall 2006) konnte nicht festgestellt werden. Wie bereits bei der β -TUBULIN-Region sollten die verwendeten Primer, wie die für RPB1, basidiomycetenspezifisch oder zumindest pilzspezifisch sein (Liu, Hodson & Hall 2006).

Auch wenn die Primer eines der wesentlichen Elemente der Amplifikation mittels der PCR-Technik darstellen, können bei der PCR auch andere Parameter, wie Annealing-Temperatur, Elongationszeit usw., zu einem Misslingen der Amplifikation beitragen (Rees; Mülhardt 2009)

Am Ende erwiesen sich die Gen-Regionen ITS und TEF1 als die besten Marker-Gene, um die Phylogenie von *Urocystis* aufzuklären. Da auch die LSU-Sequenzen Informationen enthalten, sind diese mit in die Multigen-Analyse eingeflossen. Es zeigte sich aber auch, wie schwierig es sein kann neue Gen-Marker einzuführen. Dies zeigte sich zum einen an der LBA-Region, wo eines der Probleme das Fehlen von Vergleichssequenzen ist. Ein weiteres Problem liegt mit Sicherheit auch darin, dass sich bei den hier untersuchten Organismen die Gen-Regionen schlechter eignen, die in geringer Kopienzahl vorkommen.

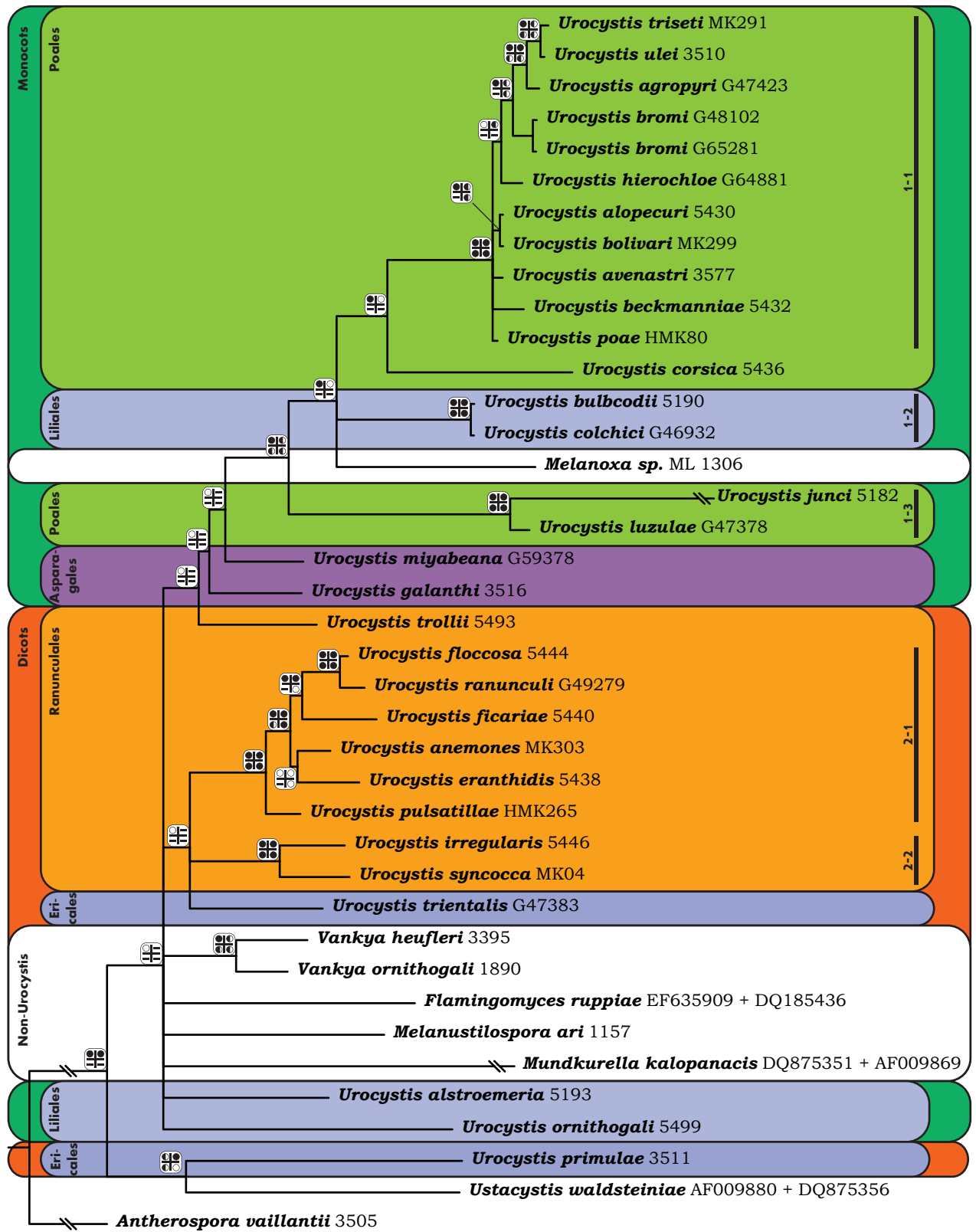
5.3 Phylogenie der Gattung *Urocystis*

Bei den *Urocystis*-Arten, die auf Monokotyledonen parasitieren, lassen sich drei monophyletische Gruppen erkennen: 1-1, 1-2 und 1-3. Diese Gruppierungen werden aufgrund der in der Multigen-Analyse gewonnenen Daten hergeleitet (Abb.) und im Folgenden diskutiert. Die Gruppe 1-1 (Abb. 23; n.S.) umfasst die Arten: *Urocystis triseti*, *Urocystis ulei*, *Urocystis agropyri*, *Urocystis bromi*, *Urocystis hierochloe*, *Urocystis alopecuri*, *Urocystis bolivari*, *Urocystis avenastri*, *Urocystis beckmanniae* und *Urocystis poae*. Hierbei handelt es sich ausnahmslos um *Urocystis*-Arten, die auf Poaceen parasitieren (Anhang 7). Gruppe 1-2 (Abb.23) beinhaltet die beiden Arten *Urocystis bulbcodii* und *Urocystis colchici*, die auf Liliaceen parasitieren. Die Gruppe 1-3 (Abb.23) schließlich besteht aus den beiden Arten *Urocystis junci* und *Urocystis luzulae*. Diese parasitieren auf Juncaceen. Die Art *Urocystis corsica*, die ebenfalls auf Poaceen parasitiert, fällt überraschenderweise in keine dieser Gruppen. Diese Beobachtung lässt sich mit der Morphologie der Sporen erklären. Dazu wird insbesondere auf die Anzahl der fertilen Sporen (Vánky 1994) in den Sporenballen zurückgegriffen. Da die Anzahl an fertilen Sporen pro Ballen je nach Art zwischen eins und fünfzig variiert, wurden diese in Sporenkategorien eingeteilt (Tab.10). Wendet man diese Sporenkategorien auf die Gruppe 1-1 – *Urocystis corsica* Problem an, so bietet sich hiermit eine Lösung für die gesonderte Stellung von *Urocystis corsica*. Alle Vertreter der Gruppe 1-1 weisen Sporenballen der Kategorie 1 und 2 auf, während der Sporenballen von *Urocystis corsica* in die Kategorie 4 fällt (Abb.23; Anhang 8). Damit wäre dann auch eine morphologische Unterscheidung gegeben, die noch deutlicher ausfällt, wenn man bedenkt, dass die Sporenballen von *Urocystis corsica* in der Regel mindestens sechs fertile Sporen aufweisen. Diese Beobachtung würde auch die basale Stellung von *Urocystis corsica* zur Gruppe 1-1 erklären, wenn man davon ausgeht, dass die Evolution von großen Sporenpaketen zu Ein-

its+lsu+tef
MrBayes
5.000.000 Generationen

Bay | ML
NJ | MP

100 76-99
100 50-75



0.01

Abb. 23: Phylogenetische Hypothese für die Gattung *Urocystis*

sporen verläuft (Vánky 2002). Wie *Urocystis corsica* lässt sich auch *Urocystis junci* in die Sporenkategorie 4 einsortieren, wobei die beiden Arten in den Analysen nicht zusammenfallen. Statt dessen ist *Urocystis junci* mit *Urocystis luzulae* zusammengruppiert, die in die Sporenkategorie 3 fällt. Diese Gruppierung lässt sich mit der Phylogenie ihrer Wirtspflanzen erklären, da beide auf Juncaceen parasitieren (Abb.23; Anhang 8). Die Juncaceen gehören, wie die Poaceen, in die Ordnung Poales, evolvierten aber in der mittleren Kreide, also früher als die Poaceen, die erst im Eozän evolvierten (Linder & Rudall 2005). Dieser zeitliche Verlauf scheint sich auch in der Phylogenie von *Urocystis* wieder zu spiegeln (Abb.23). Die Stellung von Gruppe 1-2 lässt sich gut mit der Systematik ihrer Wirtspflanzen, Vertretern der Liliales, erklären, die innerhalb der Monokotyledonen, wie die Poales, eine eigene Linie darstellen (Chase u.a. 2006).

Die Abzweigung der Gruppe 1-2 zwischen den Gruppen 1-1 und 1-3 (Abb.23) lässt sich mit der Verwandtschaft ihrer Wirtspflanzen hingegen nicht erklären, ebenso wenig die Stellung von *Urocystis alstroemeria*. Wie bei *Urocystis bulbocodii* und *Urocystis colchici* gehört die Wirtspflanze von *Urocystis alstroemeria* zu den Liliales, wenn auch in eine andere Familie, den Alstroemeriaceae. Innerhalb der Liliales sind die Liliaceae und die Alstroemeriaceae nicht nah miteinander verwandt, sondern scheinen zwei verschiedenen Gruppen anzugehören (Fay u.a. 2006). Lässt sich damit die getrennte Stellung von *Urocystis alstroemeria* zu Gruppe 1-2 erklären, reicht dies jedoch nicht aus, ihre Stellung als solche zu erklären. Diese ist auch nicht mithilfe der Sporenkategorien möglich. Eine mögliche Begründung wäre hier die geografische Trennung. Während die meisten der hier verwendeten Proben aus dem europäischen Raum sind, stammt *Urocystis alstroemeria* aus Chile (Vánky 2001). Allerdings fällt auf, dass die Stellung von *Urocystis alstroemeria* generell nicht gut aufgelöst wird und variiert (Abb.23). Lediglich bei der Maximum-Likelihood-Analyse der ITS-Region wird diese Art bei den Parasiten auf Monokotyledonen eingruppiert.

Die beiden *Urocystis*-Arten, die auf den Asparagales parasitieren, *Urocystis miyabeana* und *Urocystis galanthi*, werden in den meisten der in dieser Arbeit gewonnenen Bäume als nahe Verwandte aufgefasst, so wie auch ihren Wirtspflanzen nah verwandt sind (Asparagales 2010).

Eine weitere große Gruppe, die sich bei den meisten der Analysen erkennen lässt, enthält größtenteils *Urocystis*-Arten, die auf Dikotyledonen parasitieren (Abb.23). Innerhalb dieser Gruppe lassen sich zwei monophyletische Gruppen erkennen, die jeweils *Urocystis*-Arten beherbergen, die auf Ranunculaceen parasitieren – Gruppe 2-1 und 2-2. In die Gruppe 2-1 fallen *Urocystis anemones*, *Urocystis eranthis*, *Urocystis ficariae*, *Urocystis floccosa*, *Urocystis ranunculi* und *Urocystis pulsatillae*. Die Gruppe 2-2 beinhaltet die beiden Arten *Urocystis irregularis* und *Urocystis syncocca*. Eine weitere Art, die auf Ranunculaceen parasitiert, *Urocystis trollii*, wurde bei den meisten Analysen nicht zu diesen beiden Gruppen zugeordnet. Überraschenderweise wird diese Art häufig in die Nähe der Gruppen gestellt, die auf Monokotyledonen parasitieren (Abb.23). Mit diesen Beobachtungen scheinen sich zwei Konflikte zu ergeben: die getrennte Stellung der Gruppen 2-1 und 1-1 und die separierte Stellung von *Urocystis trollii*. Der Konflikt um die getrennte Gruppierung lässt sich wieder mit der Sporenmorphologie nachvollziehen. Lassen sich die Sporenballen der Gruppe 2-1 fast ausnahmslos in die Sporenkategorie 1 einordnen, so fallen die Sporenballen der Gruppe 2-2 in die Sporenkategorie 3. Weiter lässt sich hier sogar beobachten, dass in der Gruppe 2-1 eine Art, *Urocystis pulsatillae*, in die Sporenkategorie 2 fällt und basal als Schwestertaxon, außer bei der LSU-Analyse (Abb.16-18), innerhalb dieser Gruppe zu den anderen Gruppenmitgliedern steht. Dies steht im Einklang mit der bereits erwähnten Theorie der Sporenentwicklung. Lediglich die Stellung von *Urocystis trollii* kann mit den bisherigen Daten nicht erklärt werden. Diese Abweichung lässt sich allerdings bereits im Alignment der ITS-Sequenzen (Anhang 6) erkennen. So weisen alle Arten, die um Gruppe 1-1, 1-2 und

1-3 herum platziert sind (Abb.23), im ITS-Alignment eine Lücke von Position 155 bis 165 auf, die sich auch bei *Urocystis trollii* findet. In den anderen Alignments sind diese gruppenspezifischen Muster nicht zu erkennen.

Die phylogenetische Stellung von *Urocystis trientalis* und *Urocystis primulae*, die beide auf Primulaceen parasitieren, wird ebenfalls nicht aufgelöst. Auch hier zeigen sich gravierende Unterschiede bei den Sporenballen. Weisen die Sporenballen von *Urocystis trientalis* zwischen 6 und 50 fertile Sporen auf (Sporenkategorie 6), sind es bei *Urocystis primulae* zwischen 3 und 15 (Tab.10). Eine weitere interessante Beobachtung ist, dass *Urocystis primulae* sehr häufig zusammen mit *Ustacystis waldsteiniae* (Abb.23) zusammen gruppiert ist, vor allem, da bisher keine morphologischen Berührungspunkte für eine nahe Verwandtschaft erkennbar sind.

Generell lassen sich die Gruppen 2-1 und 2-2 anscheinend schlechter auflösen als die bisher besprochenen Gruppen. So wird Gruppe 2-1 in den LSU-Analysen (Abb.16-18) nicht monophyletisch gruppiert, wird aber in den anderen Analysen als Monophylum gut unterstützt. Hier ist davon auszugehen, dass die informativen Positionen in der LSU-Region nicht hinreichend sind. Dagegen findet Gruppe 2-2 auch in der LSU-Analyse sehr gute Unterstützung. Gruppe 2-1 und 2-2 finden sowohl bei ITS- (Abb.13-15) als auch bei TEF1-Analysen (Abb.19-22) gute Unterstützung. Bei TEF1 werden die beiden Gruppen sogar, bei Wahrung der Gruppenstruktur, monophyletisch zusammengruppiert. Diese Gruppierung bei der TEF1-Region lässt sich mit der konservierten Struktur dieser Region erklären (Baldauf 1999), welche hier, im Gegensatz zur LSU-Region, 109 statt 46 parsimony-informative Positionen aufweist.

Ein weiteres bedeutsames Ergebnis dieser Arbeit ist die phylogenetische Stellung der anderen Gattungen, die mit in diese Untersuchung eingeflossen sind. So werden die Gattungen *Melanoxa*, *Vankya*, *Flamingomyces* und *Ustacystis* alle mit in die Gattung

Urocystis gruppiert. Dieses sollte, wenn sich die Ergebnisse erhärten, taxonomische Auswirkungen auf die Gattung *Urocystis* haben.

Melanoxa sp. wird bei allen phylogenetischen Analysen, wenn auch nicht immer gleich aufgelöst, in die Nähe oder zwischen die Gruppen 1-1, 1-2 oder 1-3 gestellt. Häufig erscheint sie sogar als Schwestertaxon zu den Gruppen 1-1 und 1-3. Dies ist insbesondere deswegen interessant, da *Melanoxa* zu den Gruppen 1-1, 1-2 und 1-3 kaum Gemeinsamkeiten in den bisher besprochenen Merkmalen aufweist. Lediglich die Lücke im ITS-Alignment (Anhang 6) ist vorhanden. Zum einen weist *Melanoxa* Einzelsporen auf, zum anderen parasitiert diese Art auf *Oxalis*, einer Dikotyledone, was gegensätzlich zu den Merkmalen der anderen Gruppen wirkt. Ähnlich verhält es sich mit der Gattung *Vankya*, die ebenfalls in die Gattung *Urocystis* gruppiert wird und ebenfalls Einzelsporen aufweist. Allerdings ist die Position von *Vankya* schlechter unterstützt als die von *Melanoxa*.

Bei den Gattungen *Flamingomyces* und *Ustacystis*, die ebenfalls in die Gattung *Urocystis* fallen, sind zumindest bei den Sporenballen einige Gemeinsamkeiten zu erkennen. Während *Flamingomyces* eher isoliert platziert wird, außer bei der Neighbour-Joining-Analyse der ITS-Region, bei der eine Gruppierung mit *Urocystis trollii* zu erkennen ist, wird *Ustacystis* häufig zusammen mit *Urocystis primulae* zusammen gruppiert.

Dieser Umstand zeigt auch hier, dass das Vorhandensein von Sporenballen nicht immer ein Merkmal für Verwandtschaft darstellen muss (Vánky 2002). Auf der anderen Seite zeigt sich auch, dass die Gattung *Urocystis* paraphyletisch ist. Diese Paraphylie ist scheinbar sogar stärker ausgeprägt als bisher angenommen werden konnte (Bauer u.a. 2008).

5.4 Neuordnung der Gattung *Urocystis*

Zum Teil sind die Ergebnisse aus den Untersuchungen so eindeutig, dass es sich empfiehlt, die Gattung *Urocystis* neu zu überdenken und aufzuteilen. Diese Einteilung kann aufgrund verschiedener Kriterien geschehen. Die auf den ersten Blick einfachste Variante wäre eine Aufteilung nach Wirtspflanzenverwandtschaft, was jedoch anhand der Gesamtdatenlage mit einigen Problemen behaftet ist. Ein Problem ist, dass nicht alle *Urocystis*-Arten die auf den Monokotyledonen parasitieren zusammen gruppiert werden, wie z. B. *Urocystis alstroemeria*, die zu den Dikotyledonen gruppiert wird. Das gleiche Problem ergibt sich für die *Urocystis*-Arten, die auf Dikotyledonen parasitieren und bei denen eine zu den Monokotyledonen gruppiert wird, wobei hier die Ergebnisse besser sind (Abb. ABABA), wenn jedoch auch nicht gut genug, um diese auf Dikotyledonen parasitierenden *Urocystis*-Arten als eigene Gruppe erscheinen zu lassen. Auch eine Neugruppierung anhand der Sporenpakete erscheint schwierig, da es scheint, als ob die Evolution der Sporenballen von groß zu klein innerhalb der Gattung *Urocystis*, in ihrer bisherigen Auffassung, mehrfach erfolgt ist.

Was sich jedoch anbietet, ist eine Kombination aus der Morphologie der Sporenballen und den Wirten, jedoch zunächst auf Familienebene.

Am einfachsten erscheint dabei die Gruppe 1-1, welche sich aufgrund der phylogenetischen Analysen und anhand der Sporenballenmorphologie sehr gut umschreiben lässt. In diese Gruppe fallen ausnahmslos alle in dieser Arbeit untersuchten *Urocystis*-Arten, die auf Poaceen parasitieren (Anhang 7). Auch die Typus-Art *Urocystis occulta* parasitiert eine Poaceae, *Secale cereale*, und fällt mit ein bis drei Sporen im Sporenballen in die Sporenkategorie 1. Es ist davon auszugehen, dass diese Art mit in die Gruppe 1-1 fallen wird, wenn erfolgreich DNA-Material isoliert und sequenziert werden kann. Eine Gruppierung aus den Gruppen 1-1, 1-2, 1-3 und *Melanoxa*, welche sich auf den ersten

Blick ebenfalls anbietet, wird zurzeit nicht in Erwägung gezogen, da diese Gruppierung nicht von allen Analysen unterstützt wird. Damit ergibt sich aus den molekularphylogenetischen und morphologischen Analysen, die Gruppe 1-1 als *Urocystis* im engeren Sinne zu behandeln.

Weitere Gruppen, die in den in dieser Arbeit gewonnenen Analysen sehr gute Unterstützung aufweisen, sind 1-2, 1-3 und 2-2. Da jedoch all diese Gruppen in den bisherigen Analysen nur je zwei Arten enthalten, stellt sich die Frage, inwieweit hier zurzeit eine Gruppierung wissenschaftlich sinnvoll erscheint. Zwar gibt es monotypische Gattungen, wie z. B. *Ustacystis*, dennoch erscheint eine Gruppierung in diese Richtung als nicht angebracht, da diese Gruppen, beim jetzigen Kenntnisstand, nicht einzigartig sind. Im Gegenteil sollte vielleicht sogar die Frage gestellt werden, ob es nicht sinnvoll wäre, die Gattung *Ustacystis*, sowie die Gattungen *Vankya* und *Melanustilospora*, mit in die Gattung *Urocystis* einzugliedern. Dies würde jedoch den Verlust des morphologischen Merkmals der Sporenballen, welches mit für die Charakterisierung der Gattung *Urocystis* verwendet wird, bedeuten. Unter Berücksichtigung dieser Fragen erscheint momentan eine Einteilung in *Urocystis* sensu stricto (s. str.) mit *Urocystis triseti*, *Urocystis ulei*, *Urocystis agropyri*, *Urocystis bromi*, *Urocystis hierochloe*, *Urocystis alopecuri*, *Urocystis bolivari*, *Urocystis avenastri*, *Urocystis beckmanniae*, *Urocystis poae* und, wenn auch nicht untersucht *Urocystis occulta*, oder *Urocystis* sensu lato (s. l.) mit den anderen hier diskutierten Arten und Gattungen als sinnvoll.

Für die Zukunft wird man sich jedoch entscheiden müssen, wie man mit der Gattung *Urocystis* weiter verfahren möchte. Möchte man eine große Gruppe, *Urocystis* s. l., oder mehrere kleine Gruppen, mit *Urocystis* s. str. und weiteren Gruppen, die entsprechend benannt werden müssten. Damit verbunden sind jedoch weitere Fragen. Was passiert mit den Gattungen *Melanoxa*, *Vankya* und *Melanustilospora*, wenn man zugunsten *Uro-*

cystis s. l. entscheidet? Werden diese, aufgrund der molekularphylogenetischen Analysen, mit in die Gattung *Urocystis* aufgenommen? Oder bleiben dies eigenständige Gattungen, mit der Begründung, das bisherige System und die damit verbundenen morphologischen Erkennungsmerkmale, so wie sie zurzeit angewandt werden, zu erhalten.

Auch eine Entscheidung für kleine Gruppen um *Urocystis* s. str. herum wirft Fragen auf. Ist die Frage nach dem Zusammengruppieren der Arten zumindest für *Urocystis* s. str. scheinbar gelöst, ist dies nach dieser Arbeit für einige Arten, wie z. B. *Urocystis alstroemeria* oder *Urocystis primulae*, offen. Für diese Fälle, und zur Unterstützung der anderen in dieser Arbeit gefundenen Gruppen, empfiehlt es sich weitere Untersuchungen durchzuführen. Zum einen mit molekularphylogenetischen Methoden, vielleicht sogar mit einem vertiefenden Fokus auf die bereits genutzten Gen-Regionen, mit anderen, spezifischen Primern. Zum anderen bietet es sich auch an, auf andere morphologische Merkmale, wie Sporengröße, Oberflächenstrukturen oder sogar ultrastrukturelle Merkmale einzugehen. Mit diesen Untersuchungen sollte es dann möglich sein, die Phylogenie von *Urocystis* noch weiter aufzuklären.

6 Zusammenfassung

Die zu den Ustilaginomycotina gehörende Gattung *Urocystis* ist in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal im großen Maßstab bearbeitet worden. Dabei war es möglich, ein Viertel der weltweit ungefähr 140 *Urocystis*-Arten zu untersuchen. Das Hauptziel dieser Arbeit war die Aufklärung der Phylogenie der Gattung *Urocystis*, von der sich andeutete das es sich um eine paraphyletische Gattung handeln könnte.

Um diese Ziele zu erreichen, wurden molekularphylogenetische Methoden eingesetzt. Die Gen-Region ITS-rDNA, LBA, LSU-rDNA und TEF1 konnten erfolgreich amplifiziert und sequenziert werden. Neben diesen Genregionen wurden die Genregionen ATP6, β -TUB, COX3, IGS, RPB1 und RPB2 getestet. Dabei war es jedoch nicht möglich, eine erfolgreiche Amplifikation nachzuweisen. Ein wesentliches Problem bei diesen Markern ist, das sie allgemein in geringer Kopienzahl im Genom vorkommen und somit sehr gute DNA-Qualität erfordern.

Aus den Sequenzen der erfolgreich amplifizierten Genregionen ITS, LSU und TEF1 wurde jeweils ein Alignment erstellt, welche als Grundlage zur Erstellung einer Multigen-Phylogenie diente. Für die phylogenetischen Analysen sind die zurzeit gängigen Rekonstruktionsmethoden Neighbour-Joining, Maximum-Parsimony, Maximum-Likelihood sowie die Bayessche Statistik angewendet worden.

Zur Unterstützung der in der Multigen-Analyse erhaltenden Phylogenie wurde auf die Morphologie der Sporenballen zurückgegriffen. Trotz des Einsatzes sowohl von drei Gen-Regionen wie der Sporenmerkmalen war es nicht möglich, für alle *Urocystis*-Arten eine befriedigende Auflösung zu erhalten. Einige der *Urocystis*-Arten waren jedoch Gruppierungen gut unterstützt, dass es sich anbietet, die Gattung *Urocystis* in ihrer Systematik neu zu überarbeiten. Unter *Urocystis* s. str. sollte monophyletische Gruppe der *Urocystis*-Arten zusammengefasst werden, die auf Poaceen parasitieren, und von denen in dieser Arbeit die Arten *Urocystis triseti*, *U. ulei*, *U. agropyri*, *U. bromi*, *U. hierochloae*, *U. alopecuri*, *U. bolivari*, *U. avenastri*, *U. beckmanniae* und *U. poae* untersucht wurden. Vermutlich fällt die Typus-Art *Urocystis occulta* auch in diese Gruppe.

Eine Alternative wäre *Urocystis* im weiteren Sinn zu verstehen und entsprechend die anderen *Urocystis*-Arten und unter Umständen die Gattungen *Melanoxa*, *Mundkurella*, *Ustacystis* und *Vankya* mit eingruppierten.

7 Literaturverzeichnis

- 1Binder, M. & Hibbett, David 09.18.2003. *Oligonucleotides*. URL:
http://www.clarku.edu/faculty/dhibbett/Protocols_Folder/Primers/Primers.pdf.
- Ainsworth, Geoffrey C. & Kirk, Paul M. 2008. *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*. 10. ed. Wallingford: CABI.
- Altschul, Stephen F., u.a. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3), 403–410.
- Asparagales* 2010. URL:
<http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/orders/asparagalesweb.htm#Asparagales> [Stand 2010-12-08].
- Atchley, W. R. & Fitch, W. M. 1988. Gene trees and the origins of inbred strains of mice. *Geology* 16, 354.
- Bacigálová, K., u.a. 2005. *Vankya vaillantii* (Ustilaginomycetes) on *Scilla* in Central Europe. *Polish Botanical Journal* 50(2), 145–151.
- Baldauf, S. L. & Palmer, J. D. 1993. Animals and fungi are each other's closest relatives: congruent evidence from multiple proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(24), 11558–11562
- Baldauf, Sandra L. 1999. A Search for the Origins of Animals and Fungi: Comparing and Combining Molecular Data. *The American Naturalist* 154(S4), S178-S188.
- Bartnicki-Garcia, S., Nelson, Nancy & Cota-Robles, E. 1968. Electron microscopy of spore germination and cell wall formation in *Mucor rouxii*. *Archives of Microbiology* 63(3), 242–255.
- Bauer, R., Begerow, D. & Oberwinkler, F. 1998. Fortschritte in der Systematik der Brandpilze. *Journal of Plant Diseases and Protection* 105(3), 224–238.
- Bauer, Robert, u.a. 2008. Anther smut fungi on monocots. *Mycological Research* 112(11), 1297–1306.
- Bauer, Robert & Oberwinkler, Franz 2008. Cellular Ustilaginomycete–Plant Interactions, in Varma, Ajit, u.a. (Hg.): *Plant Surface Microbiology*: Springer Berlin Heidelberg, 227–236.
- Begerow, D., Bauer, R. & Oberwinkler, F. 1997. Phylogenetic studies on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences of smut fungi and related taxa. *Canadian Journal of Botany* 75(12), 2045–2056.
- Begerow, D., John, B. & Oberwinkler, F. 2004. Evolutionary relationships among [β]-tubulin gene sequences of basidiomycetous fungi. *Mycological Research* 108(11), 1257–1263.
- Begerow, Dominik, Bauer, Robert & Boekhout, Teun 2000. Phylogenetic placements of ustilaginomycetous anamorphs as deduced from nuclear LSU rDNA sequences. *Mycological Research* 104(01), 53–60.
- Begerow, Dominik, u.a. 2010. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87(1), 99–108.
- Begerow, Dominik, Stoll, Matthias & Bauer, Robert 2006. A phylogenetic hypothesis of Ustilaginomycotina based on multiple gene analyses and morphological data. *Mycologia* 98(6), 906–916.
- Blackwell, Meredith, u.a. 2006. Research Coordination Networks: a phylogeny for kingdom Fungi (Deep Hypha). *Mycologia* 98(6), 829–837.

- Boekhout, T., Fell, J. W. & O'Donnell, K. 1995. Molecular systematics of some yeast-like anamorphs belonging to the Ustilaginales and Tilletiales. *Studies in Mycology*, 175–183.
- Boekhout, Teun, u.a. 2010. *Malassezia and the Skin: Science and Clinical Practice*. Berlin.
- Brandon Matheny, P., u.a. 2007. Contributions of *rpb2* and *tefl* to the phylogeny of mushrooms and allies (Basidiomycota, Fungi). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43(2), 430–451.
- Bruns, T. D., White, T. J. & Taylor, J. W. 1991. Fungal Molecular Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22(1), 525–564.
- Bruns, Thomas D., u.a. 1992. Evolutionary relationships within the fungi: Analyses of nuclear small subunit rRNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1(3), 231–241.
- Cantino, E. C., u.a. 1963. The Single Mitochondrion, Fine Structure, and Germination of the Spore of *Blastocladiella emersonii*. *J Gen Microbiol* 31(3), 393–404.
- Chase, M. W., u.a. 2006. Multigene analyses of monocot relationships: a summary. *Aliso* 22, 63–75.
- Chen, Bing-Yuan 2002. *PCR cloning protocols*. 2. ed. Totowa, NJ: Humana Press. (Methods in molecular biology, 192).
- Chen, S. H., u.a. 2003. Primer Design Assistant (PDA): a web-based primer design tool. *Nucl. Acids Res.* 31(13), 3751–3754.
- Clark, David P., Held, Andreas & Held, Manuela 2006. *Molecular biology: Das Original mit Übersetzungshilfen ; understanding the genetic revolution*. 1. Aufl. München: Elsevier Spektrum Akad. Verl. (Easy reading).
- Dai, Yu-Cheng, u.a. 2006. Phylogeny and a new species of *Sparassis* (Polyporales, Basidiomycota): evidence from mitochondrial *atp6*, nuclear rDNA and *rpb2* genes. *Mycologia* 98(4), 584–592.
- Einax, Esra & Voigt, Kerstin 2003. Oligonucleotide primers for the universal amplification of [β]-tubulin genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum Fungi. *Organisms Diversity & Evolution* 3(3), 185–194.
- Fay, M. F., u.a. 2006. Phylogenetics of Liliales: summarized evidence from combined analyses of five plastid and one mitochondrial loci. *Aliso* 22, 559–565.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39(4), 783–791.
- Felsenstein, Joseph 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* 17(6), 368–376.
- Gorokhova, Elena, u.a. 2002. Functional and ecological significance of rDNA intergenic spacer variation in a clonal organism under divergent selection for production rate. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 269(1507), 2373–2379.
- Guidot, A., u.a. 1999. The nuclear ribosomal DNA intergenic spacer as a target sequence to study intraspecific diversity of the ectomycorrhizal basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum* directly on pinus root systems. *Appl Environ Microbiol* 65(3), 903–909.
- Hall, T. A. 1999. *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT: Nucleic acids symposium series*. (41).
- Hansen, Andrea 2004. *Bioinformatik: Ein Leitfaden für Naturwissenschaftler*. 2., überarb. und erw. Aufl. Basel: Birkhäuser.
- Hasegawa, Masami, Kishino, Hirohisa & Yano, Taka-aki 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22(2), 160–174.

- Hawksworth, D. L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research* 95(6), 641–655.
- Hawksworth, David L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 105(12), 1422–1432.
- Hibbett, D. S., u.a. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111(5), 509–547.
- Huelsenbeck, John P., u.a. 2001. Bayesian Inference of Phylogeny and Its Impact on Evolutionary Biology. *Science* 294(5550), 2310–2314.
- James, Timothy Y., u.a. 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443(7113), 818–822.
- James, Timothy Y., u.a. 2001. Polymorphism at the Ribosomal DNA Spacers and Its Relation to Breeding Structure of the Widespread Mushroom *Schizophyllum commune*. *Genetics* 157(1), 149–161.
- Karwasra, S. S., Beniwal, M. S. & Chhabra, M. L. 2008. Cultural variability among nine isolates of *Urocystis agropyri* on wheat. *Bangladesh Journal of Agricultural Research* 33(3), 347.
- Katoh, Kazutaka & Toh, Hiroyuki 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics* 9(4), 286–298.
- Kemler, Martin, Begerow, Dominik & Lutz, Matthias. *Biodiversität von Brand- und Rostpilzen auf der Alp Flix*.
- Kendrick, Bryce 2000. *The Fifth Kingdom*. 3. ed. Newburyport MA: Focus Publ.
- Kimura, Motoo 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16(2), 111–120.
- Knippers, Rolf (Hg.) 2001. *Molekulare Genetik: 66 Tabellen*. 8., neubearb. Aufl. Stuttgart: Thieme
- Knoop, Volker & Müller, Kai 2009. *Gene und Stammbäume: Ein Handbuch zur molekularen Phylogenetik*. 2. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Kretzer, Annette M. & Bruns, Thomas D. 1999. Use of atp6 in Fungal Phylogenetics: An Example from the Boletales. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13(3), 483–492.
- Linder, H. P. & Rudall, Paula J. 2005. EVOLUTIONARY HISTORY OF POALES. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36(1), 107–124.
- Liu, Y. J., Whelen, S. & Hall, B. D. 1999. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Mol Biol Evol* 16(12), 1799–1808.
- Liu, Yajuan, Hodson, Matthew & Hall, Benjamin 2006. Loss of the flagellum happened only once in the fungal lineage: phylogenetic structure of Kingdom Fungi inferred from RNA polymerase II subunit genes. *BMC Evolutionary Biology* 6(1), 74.
- Liu, Yajuan J. & Hall, Benjamin D. 2004. Body plan evolution of ascomycetes, as inferred from an RNA polymerase II phylogeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(13), 4507–4512.
- Ludwig-Mayerhofer, W. 2010. *ILMES - Maximum Likelihood-Schätzung*.
- Lutzoni, Francois, u.a. 2004. Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *Am. J. Bot.* 91(10), 1446–1480.
- M. GARDES & T. D. BRUNS 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology Notes* 2(2), 113–118.
- Melen, Gustavo J., u.a. 1999. Novel processing in a mammalian nuclear 28S pre-rRNA: tissue-specific elimination of an 'intron' bearing a hidden break site. *EMBO J* 18(11), 3107–3118.

- Mülhardt, Cornel 2009. *Der Experimentator Molekularbiologie, Genomics*. 6. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akad.-Verlag.
- Müller, Hans-Joachim 2001. *Polymerase-Kettenreaktion (PCR): Das Methodenbuch*. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.
- MÜLLER, JÖRN & Müller, Kai 2004. treegraph: automated drawing of complex tree figures using an extensible tree description format. *Molecular Ecology Notes* 4(4), 786–788.
- Nylander, J. A. 2004. MrModeltest, version 2.3. *Program distributed by the author*. Uppsala: Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Piepenbring, M., Bauer, R. & Oberwinkler, F. 1998. Teliospores of smut fungi teliospore connections, appendages, and germ pores studied by electron microscopy; phylogenetic discussion of characteristics of teliospores. *Protoplasma* 204(3), 202–218.
- Posada, D. & Crandall, K. A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14(9), 817–818.
- Purdy, Laurence 1965. Flag smut of wheat. *The Botanical Review* 31(4), 565–606. Online im Internet: URL: <http://dx.doi.org/10.1007/BF02858609>.
- Rees, C. T. *Laborjournal online: Methoden - Pleiten, Chaos, Rennerei*. URL: <http://www.laborjournal.de/rubric/methoden/methoden/v3.lasso> [Stand 2010-12-11].
- Rehner, Stephen A. & Samuels, Gary J. 1994. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycological Research* 98(6), 625–634.
- Ronquist, Fredrik 2010. *MrBayes version 3.2 Tutorial*. URL: http://people.sc.fsu.edu/~fronquis/mrbayes/MrBayesTutorial_v3.2.pdf.
- Rosen, Dalia, u.a. 1974. Biogenesis of Mitochondria in *Trichoderma viride*: Structural Changes in Mitochondria and Other Spore Constituents during Conidium Maturation and Germination. *J Gen Microbiol* 83(1), 31–49.
- Rudolf, Matthias & Kuhlisch, Wiltrud 2008. *Biostatistik: Eine Einführung für Biowissenschaftler*. München: Pearson Studium. (bio - Biologie).
- Saiki, R. K., u.a. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230(4732), 1350–1354.
- Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4(4), 406–425.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74(12), 5463–5467.
- Schartmann, Ralf 2003. ATP6 als molekularphylogenetischer Marker bei Basidiomyceten. Wissenschaftliche Arbeit. Eberhard-Karls-Universität.
- Schenk, P. 1958. De infectiecyclus van *Urocystis gladiolicola* op gladiolen. *European Journal of Plant Pathology* 64(5), 475–478.
- Schirawski, J., u.a. 2005. Mating type loci of *Sporisorium reilianum*: novel pattern with three a and multiple b specificities. *Eukaryotic Cell* 4(8), 1317.
- Schmit, John & Mueller, Gregory 2007. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. *Biodiversity and Conservation* 16(1), 99–111.
- Scholz, H. & Scholz, I. 1988. Die Brandpilze Deutschlands (Ustilaginales). *Englera*, 1–691.
- Silvestro, D. & Michalak, I. raxmlGUI 0.9 beta.
- Stamatakis, A. Inferring Phylogenies with RAxML-VI-HPC.
- Stamatakis, A., Ludwig, T. & Meier, H. 2005. RAxML-III: a fast program for maximum likelihood-based inference of large phylogenetic trees. *Bioinformatics* 21(4), 456.

- Storch, Volker, Welsch, Ulrich & Wink, Michael 2007. *Evolutionsbiologie*. 2., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. (Springer-11777 /Dig. Serial)]_Online im Internet: URL: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-68211-0>.
- Strasburger, Eduard & Bresinsky, Andreas 2008. *Lehrbuch der Botanik*. 36. Aufl. / Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.
- Studier, J. A. & Keppler, K. J. 1988. A note on the neighbor-joining algorithm of Saitou and Nei. *Molecular Biology and Evolution* 5(6), 729–731.
- Swofford 2003. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0b10.
- Talavera, G. & Castresana, J. 2007. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic biology* 56(4), 564–577.
- Tambor, José, u.a. 2006. The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the dermatophyte fungus *Epidermophyton floccosum*. *Current Genetics* 49(5), 302–308.
- Tamura, Koichiro, u.a. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24(8), 1596–1599.
- Tavaré, S. 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Some mathematical questions in biology—DNA sequence analysis* 17, 57–86.
- Telle, Sabine A. 2008. Amplification of *cox2* (~620 bp) from 2 mg of Up to 129 Years Old Herbarium Specimens, Comparing 19 Extraction Methods and 15 Polymerases. *PLoS ONE* 3(10), e3584.
- van der Merwe, Marlien, u.a. 2007. Evolutionary relationships among species of *Puccinia* and *Uromyces* (Pucciniaceae, Uredinales) inferred from partial protein coding gene phylogenies. *Mycological Research* 111(2), 163–175.
- Vánky, K. 1990. The genus *Mundkurella* (Ustilaginales). *Mycological Research* 94(2), 269–273.
- Vánky, K. 2001. Taxonomical studies in Ustilaginales. XXI. *Mycotaxon*(78), 265–326.
- Vánky, K. 2002. The smut fungi of the world. A survey. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 49(2), 163–175.
- Vánky, Kálmán 1994. *European smut fungi*. Stuttgart: Fischer.
- Vánky, Kálmán, Lutz, Matthias & Bauer, Robert 2008. About the genus *Thecaphora* (Glomosporiaceae) and its new synonyms. *Mycological Progress* 7(1), 31–39.
- Vilgalys, R. & Hester, M. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J. Bacteriol.* 172(8), 4238–4246.
- Vinogradov, A. D. 1999. Mitochondrial ATP synthase: fifteen years later. *Biochemistry (Moscow)* 64(11), 1219–1229.
- Webster, John & Weber, Roland 2008. *Introduction to fungi*. 3. ed., repr. Cambridge: Cambridge Univ. Press.
- Wehner, Rüdiger, Gehring, Walter & Kühn, Alfred 1995. *Zoologie*. 23., neu bearb. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- White, Tj, u.a. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, in Innis, Ma, u.a. (Hg.): *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*: Academic Press, 315–322.
- Whitehead, T. 1921. On the life history and morphology of *Urocystis Cepulae*: With plate II. *Transactions of the British Mycological Society* 7(1-2), 65-71, IN2.
- Zhang, Z., u.a. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7(1-2), 203–214.

8 Anhang

Anhang 1: PCR-Programme

ATP6-V2		ATP6-V3	
	Temp: Calculated		Temp: Calculated
1	94°C, 2:00min	1	94°C, 2:00min
2	94°C, 0:35	2	94°C, 0:35
3	37°C, 1:00	3	37°C, 1:00
4	RAMP 0,2°C/s → 72°C	4	RAMP 0,2°C/s → 72°C
5	72°C, 1:00min	5	72°C, 1:00min
6	GOTO2, 4x	6	GOTO2, 6x
7	94°C, 0:30min	7	94°C, 0:35min
8	45°C, 1:00min	8	40°C, 1:00min
9	72°C, 1:00min +4 sec/cycle	9	72°C, 1:00min +4 sec/cycle
10	GOTO7, 35x	10	GOTO7, 39x
11	72°C, 10:00min	11	72°C, 10:00min
12	6°C, for ever	12	6°C, for ever
13	END	13	END

βT-13-V1		βT-14-V1	
Con	Temp: Calculated	Con	Temp: Calculated
1	96°C, 3:00min	1	96°C, 3:00min
2	96°C, 0:45min	2	96°C, 0:45min
3	40°C, 1:40min	3	50°C, 1:40min
4	72°C, 2:00min	4	72°C, 2:00min
5	GOTO2, 2x	5	GOTO2, 2x
6	96°C, 0:45min	6	96°C, 0:45min
7	40°C, 1:00min -10C/cycle	7	50°C, 1:00min -10C/cycle
8	72°C, 1:40min	8	72°C, 1:40min
9	GOTO7, 9x	9	GOTO7, 9x
10	96°C, 0:30min	10	96°C, 0:30min
11	40°C, 0:45min	11	50°C, 0:45min
12	72°C, 2:00min	12	72°C, 2:00min

13 GOTO10, 25x
 14 70°C, 8:00min
 15 6°C, for ever
 16 END

13 GOTO10, 25x
 14 70°C, 8:00min
 15 6°C, for ever
 16 END

COX3

COX3-V2

Temp: Calculated
 1 96°C, 2:00min
 2 96°C, 0:30
 3 37°C, 1:00
 4 RAMP 0,2°C/s → 72°C
 5 72°C, 1:00min
 6 GOTO2, 4x
 7 96°C, 0:30min
 8 45°C, 1:00min
 9 72°C, 1:00min
 10 GOTO7, 30x
 11 72°C, 10:00min
 12 6°C, for ever
 13 END

Con Temp: Calculated
 1 94°C, 2:00min
 2 94°C, 0:30
 3 37°C, 1:00
 4 RAMP 0,2°C/s → 72°C
 5 72°C, 1:00min
 6 GOTO2, 4x
 7 94°C, 0:30min
 8 45°C, 1:00min
 9 72°C, 1:00min +4sec/cycle
 10 GOTO7, 40x
 11 72°C, 10:00min
 12 6°C, for ever
 13 END

EF1A/TOU

EF983

Con
 1 95°C, 3:00min
 2 95°C, 0:30min
 3 66°C, 0:30min mit INCREASE von -1°C/cycle
 4 72°C, 1:30min
 5 GOTO 2, 9x
 6 95°C, 0:30min
 7 56°C, 0:45min
 8 72°C, 1:30min
 9 GOTO 6, 33x
 10 72°C, 7:00
 11 6°C, for ever
 12 END

Con Temp: Calculated
 1 96°C, 2:00min
 2 96°C, 0:20min
 3 53°C, 0:40min
 4 72°C, 1:00min
 5 GOTO2, 34x
 6 72°C, 34x
 7 10°C, for ever
 8 END

IGS-LR12		IGS-LR20R	
Con	Calc	Con	Calc
1	94°C, 2:00min	1	94°C, 3:00min
2	94°C, 0:35min	2	94°C, 0:35min
3	48°C, 0:55min	3	45°C, 0:45min
4	72°C, 1:00min	4	72°C, 1:00min
5	GOTO2, 13x	5	GOTO2, 13x
6	94°C, 0:35min	6	94°C, 0:35min
7	48°C, 0:55min	7	45°C, 0:55min
8	72°C, 2:00min	8	72°C, 1:30min
9	GOTO6, 13x	9	GOTO6, 13x
10	94°C, 0:35min	10	94°C, 0:35min
11	48°C, 1:00min	11	45°C, 1:00min
12	72°C, 2:30min	12	72°C, 2:00min
13	GOTO10, 9x	13	GOTO10, 9x
14	72°C, 10:00min	14	72°C, 10:00min
15	60°C, for ever	15	60°C, for ever
16	END	16	END

IGS-LR22		IGS-LR23	
Con	Calc	Con	Calc
1	96°C, 3:00min	1	96°C, 3:00min
2	96°C, 0:35min	2	96°C, 0:35min
3	55°C, 0:45min	3	55°C, 0:45min
4	72°C, 1:00min	4	72°C, 1:00min
5	GOTO2, 13x	5	GOTO2, 13x
6	96°C, 0:35min	6	96°C, 0:35min
7	55°C, 0:55min	7	55°C, 0:55min
8	72°C, 1:30min	8	72°C, 1:30min
9	GOTO6, 13x	9	GOTO6, 13x
10	96°C, 0:35min	10	96°C, 0:35min
11	55°C, 1:00min	11	55°C, 1:00min
12	72°C, 2:00min	12	72°C, 2:00min
13	GOTO10, 9x	13	GOTO10, 14x
14	72°C, 10:00min	14	72°C, 10:00min
15	6°C, for ever	15	6°C, for ever

16 END

16 END

ITS1-4

ITS1-4LA

Con	Block
1	96°C, 2:00min
2	96°C, 0:20min
3	52°C, 0:40min
4	72°C, 1:00min
5	GOTO2, 34x
6	72°C, 7:00min
7	10°C, for ever
8	END

Con	Block
1	96°C, 2:00min
2	96°C, 0:20min
3	52°C, 0:40min
4	72°C, 1:00min
5	GOTO2, 39x
6	72°C, 7:00min
7	10°C, for ever
8	END

LROR-LR6

NL4

Con	Calc
1	96°C, 2:00min
2	96°C, 0:20min
3	45°C, 0:40min
4	72°C, 1:00min
5	GOTO2, 40x
6	72°C, 7:00min
7	10°C, for ever
8	END

Con	Calc
1	96°C, 2:00min
2	96°C, 0:20min
3	52°C, 0:50min
4	72°C, 1:30min
5	GOTO2, 34x
6	72°C, 7:00min
7	10°C, for ever
8	END

ROK245

ROK255

Con	Block
1	96°C, 2:00min
2	96°C, 0:20min
3	54°C, 1:00min
4	72°C, 1:00min
5	GOTO2, 34x
6	72°C, 7:00min
7	10°C, for ever
8	END

Con	Block
1	96°C, 2:00min
2	96°C, 0:20min
3	49°C, 1:00min
4	72°C, 1:00min
5	GOTO2, 34x
6	72°C, 7:00min
7	10°C, for ever
8	END

RPB1-TOU		RPB1-TOU2	
Con	Calc	Con	Calc
1	95°C, 4:00min	1	95°C, 4:00min
2	95°C, 1:00min	2	95°C, 1:00min
3	50°C, 1:30min	3	55°C, 1:30min
4	RAMP, 0,3°C/s → 72°C	4	RAMP, 0,3°C/s → 72°C
5	72°C, 2:00min	5	72°C, 2:00min
6	GOTO2, 34x	6	GOTO2, 34x
7	72°C, 10:00min	7	72°C, 10:00min
8	6°C, for ever	8	6°C, for ever
9	END	9	END

RPB1		RBP1-V2	
Con	Calc	Con	Calc
1	95°C, 4:00min	1	96°C, 2:00min
2	95°C, 1:00min	2	96°C, 0:30min
3	55°C, 1:30min	3	53°C, 1:30min
4	RAMP, 0,2°C/s → 72°C	4	RAMP, 0,2°C/s → 72°C
5	72°C, 2:00min	5	72°C, 2:00min
6	GOTO2, 36x	6	GOTO2, 39x
7	72°C, 10:00min	7	72°C, 10:00min
8	6°C, for ever	8	6°C, for ever
9	END	9	END

RBP1-V3		RPB2	
Con	Calc	Con	Block
1	94°C, 2:00min	1	96°C, 2:00min
2	94°C, 0:30min	2	95°C, 1:00min
3	40°C, 1:00min	3	55°C, 2:00min
4	RAMP, 0,2°C/s → 72°C	4	72°C, 2:00min
5	72°C, 2:00min	5	GOTO2, 29x
6	GOTO2, 39x	6	72°C, 7:00min
7	72°C, 10:00min	7	10°C, for ever
8	6°C, for ever	8	END
9	END		

RPB2-2LA		RPB2-LA	
Con	Block	Con	Block
1	96°C, 2:00min	1	96°C, 2:00min
2	95°C, 1:00min	2	95°C, 1:00min
3	50°C, 2:00min	3	55°C, 2:00min
4	72°C, 2:00min	4	72°C, 2:00min
5	GOTO2, 39x	5	GOTO2, 39x
6	72°C, 10:00min	6	72°C, 7:00min
7	10°C, for ever	7	10°C, for ever
8	END	8	END

SLE001	
Con	Block
1	96°C, 2:00min
2	96°C, 0:20min
3	53°C, 1:00min
4	72°C, 1:00min
5	GOTO2, 40x
6	72°C, 7:00min
7	10°C, for ever
8	END

Anhang 3: benutzte Kommandos der einzelnen Phylogenieprogramme

Neighbour Joining-Analysen mit Bootstrap-Berechnung (PAUP*4.0b10) wurden mit folgendem Block aufgerufen:

```
begin paup;

log file=NJ_NJBootstrap_GTR_log.log;

set criterion=distance maxtrees=1000 increase=auto
torder=left taxlabels=full;

dset distance=GTR missdist=infer negbrlen=prohibit;

nj showtree=yes treefile=nj_gtr_tree.tre brlens=yes;

bootstrap nreps=1000 search=nj tree-
file=nj_gtr_bs_tree.tre brlens=yes conlevel=50;

savetrees from=1 to=1 file=nj_gtr_bscon_tree.tre save-
bootp=nodelabels;

log stop;

end;
```

Die Maximum-Parsimony-Analysen (mit PAUP*4.0b10) wurde mit folgenden Kommandoblock aufgerufen:

```
begin PAUP;

[factory;]

set maxtrees=10000;
```

```
log file=MPhrbt.log;

set criterion=parsimony;

pset gapmode=missing;

bootstrap      nreps=1000      search=heuristic      tree-
file=MPhrbt.tre

/ addseq=random nreps=10 swap=TBR;

savetrees      from=1      to=1      file=namecon.tre      save-
bootp=nodelabels;

log stop;

end;
```

Die Maximum-Likelihood-Analyse wurde mit (RAxML 7.2.6)

```
raxmlHPC-Windows.exe -T 2 -f a -x 229 -m GTRGAMMA -p
402 -N autoFC -s INFILE.phylip -n TREEFILE.tre -w OUT-
FILE
```

Die Bayessche-Analyse (MrBayes 3.2) wurde mit folgenden Befehlsblock gestartet:

```
Lset nst=6 rates=invgamma;

Prset statefreqpr=fixed(equal);

mcmc ngen=2000000 samplefreq=100 printfreq=1000 check-
point=yes checkfreq=10000 savebrlens=yes;
```


Bei unerwartet unterbrochenen Analysen wurden diese mit einem erweiterten Befehlsblock wieder aufgenommen:

```
Lset  nst=6  rates=invgamma;

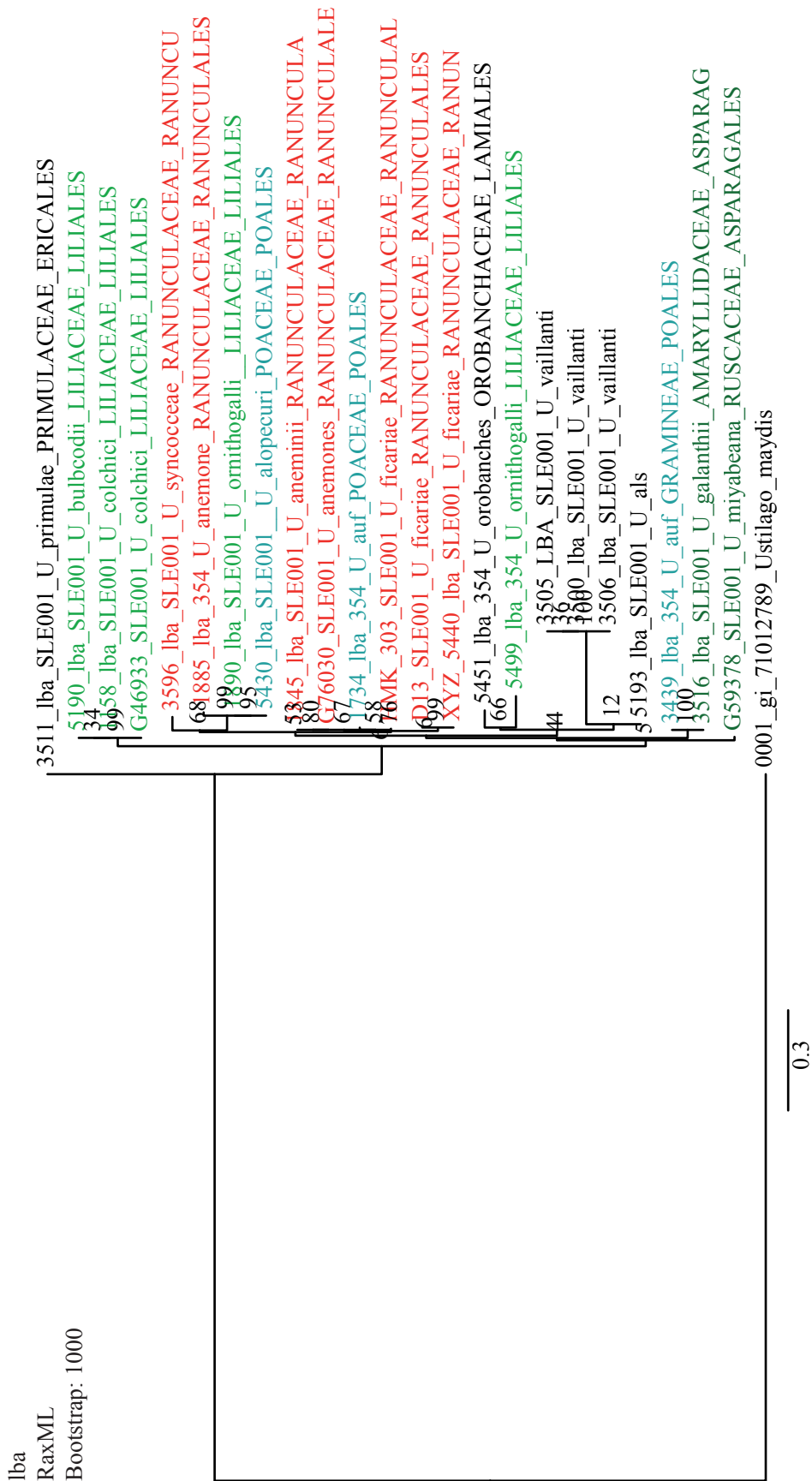
Prset  statefreqpr=fixed(equal);

mcmc   append=yes      ngen=2000000      samplefreq=100
printfreq=1000  checkpoint=yes  checkfreq=10000  saveb-
rlens=yes;
```

Die Berechnungen wurden so lange durchgeführt bis die „split frequencies“ dauerhaft unter 0,01 lagen. Abschließende Analyse und Baumberechnung erfolgte mit:

```
sump  burnfrac=0.25  und
sumt  burnfrac=0.25
```

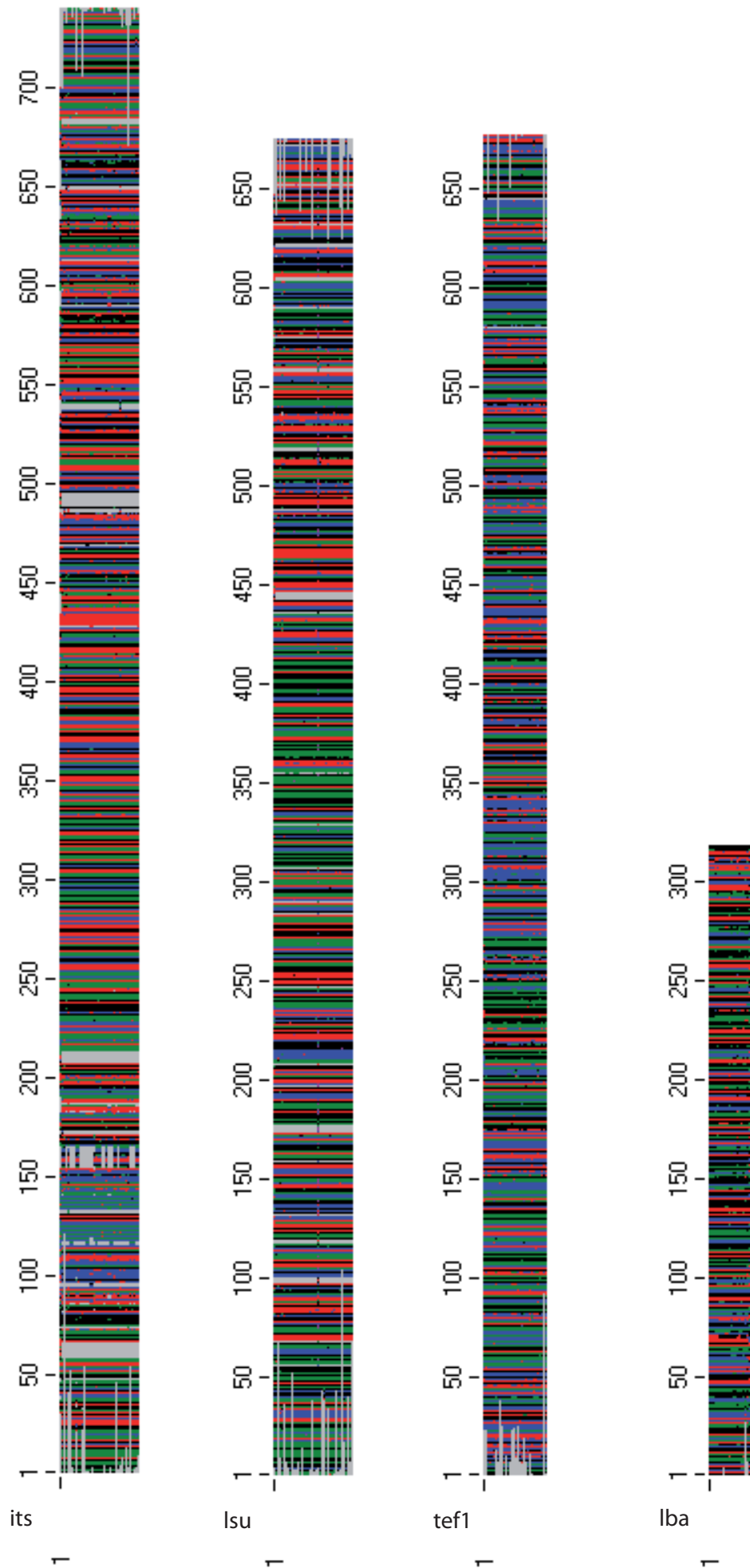
Anhang 4: Maximum-Likelihood-Analyse der LBA-Region



Anhang 5: Gesamtverzeichnis der Gattung *Urocystis* des Herbariums Görlitz (GLM)

Spezies	Wirt	Familie	Herbar-Nr.	Fund	Zweit-Infektion
???	???		48058		
<i>Urocystis agropyri</i>	<i>Elymus repens</i>	Poaceae	054513	2002/05/23	Blumeria graminis
<i>Urocystis agropyri</i>	<i>Elymus repens</i>	Poaceae	054517	2002/05/28	
<i>Urocystis agropyri</i>	<i>Elymus repens</i>	Poaceae	47423	2001/06/15	Ustil. sypod.
<i>Urocystis agropyri</i>	<i>Elymus repens</i>	Poaceae	48080	1992/06/14	Erys. graminis
<i>Urocystis agropyri</i>	<i>Elymus repens</i>	Poaceae	48081	1996/06/19	
<i>Urocystis agropyri</i>	<i>Elymus repens</i>	Poaceae	48082	1995/07/07	
<i>Urocystis agropyri</i>	<i>Elymus repens</i>	Poaceae	48103	1990/06/14	
<i>Urocystis agropyri</i>	<i>Elymus repens</i>	Poaceae	48104	1992/06/05	
<i>Urocystis agropyri</i>	<i>Elymus repens</i>	Poaceae	48105	1995/06/18	
<i>Urocystis agropyri</i>	<i>Elymus repens</i>	Poaceae	50405	1999/06/06	
<i>Urocystis agropyri</i>	<i>Elymus repens</i>	Poaceae	59383	2002/06/01	
<i>Urocystis agropyri</i>	<i>Elytrigia repens</i>	Poaceae	64724	2004/05/27	
<i>Urocystis agropyri</i>	<i>Elytrigia repens</i>	Poaceae	64780	2004/08/29	
<i>Urocystis agropyri</i>	<i>Elymus repens</i>	Poaceae	64886	2004/06/20	
<i>Urocystis agropyri</i>	<i>Elymus repens</i>	Poaceae	64887	2004/06/16	
<i>Urocystis agropyri</i>	<i>Elymus repens</i>	Poaceae	65280	2003/06/07	
<i>Urocystis alopecurus</i>	<i>Alopecurus aequalis</i>	Poaceae	07201	1980/08/18	
<i>Urocystis anemomes</i>	<i>Anemone nemerosa</i>	Ranunculaceae	054538	2002/04/10	
<i>Urocystis anemomes</i>	<i>Anemone nemerosa</i>	Ranunculaceae	054548	2002/04/28	Tranzschelia fusca
<i>Urocystis anemomes</i>	<i>Anemone nemerosa</i>	Ranunculaceae	47058	2000/05/13	
<i>Urocystis anemomes</i>	<i>Anemone nemerosa</i>	Ranunculaceae	47422	2001/05/03	
<i>Urocystis anemomes</i>	<i>Anemone nemerosa</i>	Ranunculaceae	50308	1998/05/10	Ochrospora ariae
<i>Urocystis anemomes</i>	<i>Anemone nemerosa</i>	Ranunculaceae	50315	1998/04/08	Tranzschelia
<i>Urocystis anemomes</i>	<i>Anemone nemerosa</i>	Ranunculaceae	50316	1998/04/18	
<i>Urocystis anemomes</i>	<i>Anemone nemerosa</i>	Ranunculaceae	50317	1998/04/18	
<i>Urocystis anemomes</i>	<i>Anemone nemerosa</i>	Ranunculaceae	50321	1998/25/04	Plasmopara gygmaea
<i>Urocystis anemomes</i>	<i>Anemone nemerosa</i>	Ranunculaceae	50382	1999/04/11	Puccinia singularis
<i>Urocystis anemomes</i>	<i>Anemone nemerosa</i>	Ranunculaceae	53252	1885/05/05	
<i>Urocystis anemomes</i>	<i>Anemone nemerosa</i>	Ranunculaceae	59421	2002/05/01	
<i>Urocystis anemomes</i>	<i>Anemone nemerosa</i>	Ranunculaceae	62710	2004/04/10	
<i>Urocystis anemomes</i>	<i>Anemone nemerosa</i>	Ranunculaceae	64730	2004/04/20	Tranzschelia fusca
<i>Urocystis anemomes</i>	<i>Anemone nemerosa</i>	Ranunculaceae	64734	2004/04/21	
<i>Urocystis anemomes</i>	<i>Anemone nemerosa</i>	Ranunculaceae	64735	2004/04/21	
<i>Urocystis anemomes</i>	<i>Anemone nemerosa</i>	Ranunculaceae	64742	2004/04/22	
<i>Urocystis anemomes</i>	<i>Anemone nemerosa</i>	Ranunculaceae	64868	2004/05/01	
<i>Urocystis anemomes</i>	<i>Anemone nemerosa</i>	Ranunculaceae	64871	2004/05/15	Ochrospora ariae
<i>Urocystis anemomes</i>	<i>Anemone nemerosa</i>	Ranunculaceae	65282	2003/04/11	
<i>Urocystis anemomes</i>	<i>Anemone nemerosa</i>	Ranunculaceae	65283	2003/05/25	
<i>Urocystis anemomes</i>	<i>Anemone nemerosa</i>	Ranunculaceae	65284	2003/05/20	

<i>Urocystis anemomes</i>	<i>Anemone nemerosa</i>	Ranunculaceae	65285	2003/04/27	Tranzschelia pruni-spinosae
<i>Urocystis anemomes</i>	<i>Anemone nemerosa</i>	Ranunculaceae	65286	2003/05/01	
<i>Urocystis anemomes</i>	<i>Anemone nemerosa</i>	Ranunculaceae	65287	2003/04/27	
<i>Urocystis anemomes</i>	<i>Anemone nemerosa</i>	Ranunculaceae	76030	2005/05/04	
<i>Urocystis anemomes</i>	<i>Anemone nemerosa</i>	Ranunculaceae	76042	2005/04/21	
<i>Urocystis anemomes</i>	<i>Anemone nemerosa</i>	Ranunculaceae	76051	2005/04/22	Tranzschelia fusca
<i>Urocystis anemomes</i>	<i>Anemone nemerosa</i>	Ranunculaceae	76185	2005/04/24	
<i>Urocystis bromi</i>	<i>Bromus erectus</i>	Poaceae	48102	1992/06/19	
<i>Urocystis bromi</i>	<i>Bromus erectus</i>	Poaceae	49528	2000/05/27	
<i>Urocystis bromi</i>	<i>Bromus erectus</i>	Poaceae	65281	2003/06/19	
<i>Urocystis colchici</i>	<i>Colchicum autumnale</i>	Colchicaceae	46932	2000/06/02	
<i>Urocystis colchici</i>	<i>Colchicum autumnale</i>	Colchicaceae	46933	2000/06/10	
<i>Urocystis ficariae</i>		Ranunculaceae	38398	1901/04	
<i>Urocystis ficariae</i>	<i>Ranunculus ficariae</i>	Ranunculaceae	47377	2000/04/08	
<i>Urocystis ficariae</i>	<i>Ranunculus ficariae</i>	Ranunculaceae	49521	2000/04/08	
<i>Urocystis hierochloe</i>	<i>Hierochloe odorata</i>	Poaceae	50076	1999/05/30	
<i>Urocystis hierochloe</i>	<i>Hierochloe odorata</i>	Poaceae	64881	2004/05/24	
<i>Urocystis junci</i>	<i>Juncus balticus</i>	Juncaceae	17225	1939/07/28	
<i>Urocystis junci</i>	<i>Juncus balticus</i>	Juncaceae	17226	1939/07/28	
<i>Urocystis luzulae</i>	<i>Luzula pilosa</i>	Juncaceae	47378	2001/06/02	
<i>Urocystis miyabeana</i>	<i>Polygonatum multiflorum</i>	Ruscaceae	47384	2001/05/19	
<i>Urocystis miyabeana</i>	<i>Polygonatum multiflorum</i>	Ruscaceae	54504	2002/05/14	
<i>Urocystis miyabeana</i>	<i>Polygonatum multiflorum</i>	Ruscaceae	59378	2002/06/01	
<i>Urocystis occulta</i>	<i>Secale cereale</i>	Poaceae	17220	1934/07/14	
<i>Urocystis ranunculi</i>	<i>Ranunculus repens</i>	Ranunculaceae	49279	1997/07/02	Ramularia didyma
<i>Urocystis ranunculi</i>	<i>Ranunculus repens</i>	Ranunculaceae	50352	1999/09/04	
<i>Urocystis ranunculi</i>	<i>Ranunculus repens</i>	Ranunculaceae	60008	1982/06/18	
<i>Urocystis ranunculi-auricomi</i>	<i>Ranunculus auricomus</i>	Ranunculaceae	17262	1934/06/15	
<i>Urocystis syncocca</i>	<i>Hepatica nobilis</i>	Ranunculaceae	49254	1997/09/18	
<i>Urocystis syncocca</i>	<i>Hepatica nobilis</i>	Ranunculaceae	50359	1999/10/09	
<i>Urocystis trientalis</i>	<i>Trientalis europaea</i>	Myrsinaceae	47383	2001/08/07	
<i>Urocystis trientalis</i>	<i>Trientalis europaea</i>	Myrsinaceae	49576	1997/06/07	
<i>Urocystis trientalis</i>	<i>Trientalis europaea</i>	Myrsinaceae	49577	1997/06/07	

Anhang 6: Grafische Darstellung der verwendeten Alignments

Anhang 7: Auflistung der europäischen Urocystis-Arten mit ihren Wirtspflanzen (nach Vánky 1994)

Spezies	Wirt	Wirtsfamilie
<i>Urocystis agropyry</i>	<i>Agropyron repens</i>	Poaceae
	<i>Elymus farctus</i>	Poaceae
	<i>Elymus alascanus</i>	Poaceae
	<i>Elymus caninus</i>	Poaceae
	<i>Elymus hispidus</i>	Poaceae
	<i>Elymus repens</i>	Poaceae
	<i>Elytrigia Repens</i>	Poaceae
<i>Urocystis agropyry-campestris</i>	<i>Agropyron campestris</i>	Poaceae
	<i>Elymus pungens</i>	Poaceae
<i>Urocystis agrostidis</i>	<i>Agrostis capillaris</i>	Poaceae
	<i>Agrostis stolonifera</i>	Poaceae
<i>Urocystis alopecuri</i>	<i>Alopecuris myosuroides</i>	Poaceae
	<i>Alopecuris pratensis</i>	Poaceae
	<i>Alopecurus aequalis</i>	Poaceae
	<i>Alopecurus arundinaceus</i>	Poaceae
<i>Urocystis anemones</i>	<i>Anemone appenina</i>	Ranunculaceae
	<i>Anemone blanda</i>	Ranunculaceae
	<i>Anemone narcissiflora</i>	Ranunculaceae
	<i>Anemone nemerosa</i>	Ranunculaceae
	<i>Anemone pavonina</i>	Ranunculaceae
	<i>Anemone ranunculoides</i>	Ranunculaceae
	<i>Anemone sylvestris</i>	Ranunculaceae
	<i>Anemone trifolia</i>	Ranunculaceae
	<i>Anemone virginiana</i>	Ranunculaceae
<i>Urocystis antipoliana</i>	<i>Anemone baldensis</i>	Ranunculaceae
	<i>Anemone coronaria</i>	Ranunculaceae
	<i>Anemone pavonina</i>	Ranunculaceae
<i>Urocystis aquilegiae</i>	<i>Aquilegia aurea</i>	Ranunculaceae
<i>Urocystis asphodeli</i>	<i>Asphodelus</i>	Asphodeloideae
<i>Urocystis avenae-elatioris</i>	<i>Arrhenatherum elatius</i>	Poaceae
<i>Urocystis avenastri</i>	<i>Avenula pubescens</i>	Poaceae
	<i>Avenula versicolor</i>	Poaceae
	<i>Beckmannia eruciformis</i>	Poaceae
<i>Urocystis bolivary</i>	<i>Lolium perenne</i>	Poaceae
	<i>Lolium rigidum</i>	Poaceae
<i>Urocystis bornmuelleri</i>	<i>Melica cupanii</i>	Poaceae
<i>Urocystis brassicae</i>	<i>Brassica juncea</i>	Brassicaceae
	<i>Brassica napa</i>	Brassicaceae
	<i>Brassica nigra</i>	Brassicaceae
	<i>Brassica rapa</i>	Brassicaceae
	<i>Raphnus sativus</i>	Brassicaceae

<i>Urocystis bromi</i>	<i>Bromus commutatus</i>	Poaceae
	<i>Bromus erectus</i>	Poaceae
	<i>Bromus inermis</i>	Poaceae
	<i>Bromus inermis</i>	Poaceae
	<i>Bromus riparius</i>	Poaceae
<i>Urocystis bulbocodii</i>	<i>Bulbocodium vernum</i>	Colchicaceae
<i>Urocystis calamagrostis</i>	<i>Calamagrostis arundinacea</i>	Poaceae
	<i>Calamagrostis epigejos</i>	Poaceae
	<i>Calamagrostis stricta</i>	Poaceae
<i>Urocystis callianthemii</i>	<i>Callianthemum coriandrifolium</i>	Ranunculaceae
<i>Urocystis carcinodes</i>	<i>Actaea erythrocarpa</i>	Ranunculaceae
	<i>Actaea pachypoda</i>	Ranunculaceae
	<i>Actaea rubra</i>	Ranunculaceae
	<i>Actaea spicata</i>	Ranunculaceae
<i>Urocystis ceratocephali</i>	<i>Ceratocephalus falcatus</i>	Ranunculaceae
<i>Urocystis colchici</i>	<i>Colchicum arenarium</i>	Colchicaceae
	<i>Colchicum autumnale</i>	Colchicaceae
	<i>Colchicum bivonae</i>	Colchicaceae
	<i>Colchicum bornmuelleri</i>	Colchicaceae
	<i>Colchicum neapolitanum</i>	Colchicaceae
	<i>Colchicum triphyllum</i>	Colchicaceae
	<i>Colchicum turcicum</i>	Colchicaceae
<i>Urocystis coralloides</i>	<i>Arabis glabra</i>	Brassicaceae
	<i>Lepidium perfoliatum</i>	Brassicaceae
	<i>Mattiola sinuata</i>	Brassicaceae
<i>Urocystis corsica</i>	<i>Stipa capensis</i>	Poaceae
<i>Urocystis cortusae</i>	<i>Cortusa matthioli</i>	Primulaceae
<i>Urocystis dactylidina</i>	<i>Dactylis glomerata</i>	Poaceae
<i>Urocystis delphinii</i>	<i>Delphinium fissum</i>	Ranunculaceae
<i>Urocystis eranthidis</i>	<i>Eranthis hyemalis</i>	Ranunculaceae
<i>Urocystis ficarie</i>	<i>Ranunculus ficaria</i>	Ranunculaceae
<i>Urocystis filipendulae</i>	<i>Filipendula vulgaris</i>	Rosaceae
<i>Urocystis fischeri</i>	<i>Carex acuta</i>	Cyperaceae
	<i>Carex arenaria</i>	Cyperaceae
	<i>Carex bigelowii</i>	Cyperaceae
	<i>Carex caryophyllea</i>	Cyperaceae
	<i>Carex ericetorum</i>	Cyperaceae
	<i>Carex flacca</i>	Cyperaceae
	<i>Carex halleriana</i>	Cyperaceae
	<i>Carex hirta</i>	Cyperaceae
	<i>Carex lasiocarpa</i>	Cyperaceae
	<i>Carex leporina</i>	Cyperaceae
	<i>Carex lyngbyei</i>	Cyperaceae
	<i>Carex muricata</i>	Cyperaceae
	<i>Carex nigra</i>	Cyperaceae

	<i>Carex norwegica</i>	Cyperaceae
	<i>Carex pallescens</i>	Cyperaceae
	<i>Carex panicea</i>	Cyperaceae
	<i>Carex paniculata</i>	Cyperaceae
	<i>Carex pulicaris</i>	Cyperaceae
	<i>Carex rostrata</i>	Cyperaceae
	<i>Carex salina</i>	Cyperaceae
	<i>Carex subspathacea</i>	Cyperaceae
	<i>Carex versicaria</i>	Cyperaceae
<i>Urocystis floccosa</i>	<i>Helleborus cyclophyllus</i>	Ranunculaceae
	<i>Helleborus dumetorum</i>	Ranunculaceae
	<i>Helleborus foetidus</i>	Ranunculaceae
	<i>Helleborus multifidus</i>	Ranunculaceae
	<i>Helleborus niger</i>	Ranunculaceae
	<i>Helleborus odorus</i>	Ranunculaceae
	<i>Helleborus purpurascens</i>	Ranunculaceae
	<i>Helleborus viridis</i>	Ranunculaceae
<i>Urocystis galanthis</i>	<i>Galanthus nivalis</i>	Amaryllidaceae
<i>Urocystis gladiolicola</i>	<i>Crocus (Kultur)</i>	Iridaceae
	<i>Gladiolus (Kultur)</i>	Iridaceae
<i>Urocystis hierochloae</i>	<i>Hierochloe odorata</i>	Poaceae
<i>Urocystis hispanica</i>	<i>Aegilopsis ovata</i>	Poaceae
<i>Urocystis irregularis</i>	<i>Acontium lamarckii</i>	Ranunculaceae
	<i>Acontium moldavicum</i>	Ranunculaceae
	<i>Acontium septentrionale</i>	Ranunculaceae
	<i>Acontium variegatum</i>	Ranunculaceae
	<i>Acontium vulparia</i>	Ranunculaceae
<i>Urocystis jaapiana</i>	<i>Ruscus aculeatus</i>	Ruscaceae
<i>Urocystis johansonii</i>	<i>Juncus bufonius</i>	Juncaceae
<i>Urocystis junci</i>	<i>Juncus acutiflorus</i>	Juncaceae
	<i>Juncus arcticus</i>	Juncaceae
	<i>Juncus balticus</i>	Juncaceae
	<i>Juncus filiformis</i>	Juncaceae
<i>Urocystis kmetiana</i>	<i>Viola arvensis</i>	Violaceae
	<i>Viola kitaibeliana</i>	Violaceae
	<i>Viola tricolor</i>	Violaceae
<i>Urocystis lagerheimii</i>	<i>Juncus compressus</i>	Juncaceae
<i>Urocystis leimbachii</i>	<i>Adonis aestivalis</i>	Ranunculaceae
	<i>Adonis annua</i>	Ranunculaceae
	<i>Adonis distorta</i>	Ranunculaceae
	<i>Adonis pyrenaica</i>	Ranunculaceae
	<i>Adonis vernalis</i>	Ranunculaceae
<i>Urocystis leucoji</i>	<i>Leucojum vernum</i>	Amaryllidaceae
<i>Urocystis littoralis</i>	<i>Carex maritima</i>	Cyperaceae
<i>Urocystis luzulae</i>	<i>Luzula luzuloides</i>	Juncaceae

	<i>Luzula multiflora</i>	Juncaceae
	<i>Luzula pilosa</i>	Juncaceae
<i>Urocystis magica</i>	<i>Allium angulosum</i>	Amaryllidaceae
	<i>Allium atropurpureum</i>	Amaryllidaceae
	<i>Allium fistulosum</i>	Amaryllidaceae
	<i>Allium nigrum</i>	Amaryllidaceae
	<i>Allium oleraceum</i>	Amaryllidaceae
	<i>Allium porrum</i>	Amaryllidaceae
	<i>Allium sabulosum</i>	Amaryllidaceae
	<i>Allium saxatile</i>	Amaryllidaceae
	<i>Allium scorodoprasum</i>	Amaryllidaceae
	<i>Allium subhirsutum</i>	Amaryllidaceae
	<i>Allium vineale</i>	Amaryllidaceae
<i>Urocystis mayori</i>	<i>Sesleria albicans</i>	Poaceae
	<i>sesleria caerulea</i>	Poaceae
<i>Urocystis melicae</i>	<i>Melica ciliata</i>	Poaceae
	<i>Melica nutans</i>	Poaceae
	<i>Melica uniflora</i>	Poaceae
<i>Urocystis miyabeana</i>	<i>Polygonatum latifolium</i>	Ruscaceae
	<i>Polygonatum multiflorum</i>	Ruscaceae
	<i>Polygonatum odoratum</i>	Ruscaceae
	<i>Polygonatum verticillatum</i>	Ruscaceae
<i>Urocystis muscaridis</i>	<i>Muscari comosum</i>	Amaryllidaceae
	<i>Muscari negletum</i>	Amaryllidaceae
	<i>Muscari tenuiflorum</i>	Amaryllidaceae
<i>Urocystis mustaphae</i>	<i>Clematis alpina</i>	Ranunculaceae
<i>Urocystis nivalis</i>	<i>Ranunculus acris</i>	Ranunculaceae
	<i>Ranunculus nivalis</i>	Ranunculaceae
	<i>Ranunculus pygmaeus</i>	Ranunculaceae
	<i>Ranunculus sulphureus</i>	Ranunculaceae
<i>Urocystis occulta</i>	<i>Secale cereale</i>	Poaceae
<i>Urocystis ornithogali</i>	<i>Gagea bohemica</i>	Liliaceae
	<i>Ornithogallum umbellatum</i>	Liliaceae
	<i>Ornithogalum collinum</i>	Liliaceae
	<i>Ornithogalum narbonense</i>	Liliaceae
	<i>Ornithogalum oreoides</i>	Liliaceae
	<i>Ornithogalum orthophyllum</i>	Liliaceae
	<i>Ornithogalum pyrenaicum</i>	Liliaceae
<i>Urocystis orobanches</i>	<i>Orobanche ramosa</i>	Orobanchaceae
<i>Urocystis paridis</i>	<i>Paris quadrifolia</i>	Melanthiaceae
<i>Urocystis phlei-alpini</i>	<i>Phleum alpinum</i>	Poaceae
	<i>Phleum phleoides</i>	Poaceae
	<i>Phleum pratense</i>	Poaceae
<i>Urocystis picbaueri</i>	<i>Lloydia serotina</i>	Liliaceae
<i>Urocystis poae</i>	<i>Poa alpigena</i>	Poaceae

	<i>Poa alpina</i>	Poaceae
	<i>Poa angustifolia</i>	Poaceae
	<i>Poa annua</i>	Poaceae
	<i>Poa compressa</i>	Poaceae
	<i>Poa laxa</i>	Poaceae
	<i>Poa nemoralis</i>	Poaceae
	<i>Poa pratensis</i>	Poaceae
	<i>Poa subcaerulea</i>	Poaceae
	<i>Poa trivalis</i>	Poaceae
<i>Urocystis poae-palustris</i>	<i>Poa palustris</i>	Poaceae
<i>Urocystis primulae</i>	<i>Primula elatior</i>	Primulaceae
	<i>Primula versis</i>	Primulaceae
	<i>Primula vulgaris</i>	Primulaceae
<i>Urocystis primulicola</i>	<i>Primula farinosa</i>	Primulaceae
<i>Urocystis pulsatillae</i>	<i>Pulsatilla alba</i>	Ranunculaceae
	<i>Pulsatilla alpina</i>	Ranunculaceae
	<i>Pulsatilla halleri</i>	Ranunculaceae
	<i>Pulsatilla patens</i>	Ranunculaceae
	<i>Pulsatilla pratensis</i>	Ranunculaceae
	<i>Pulsatilla vernalis</i>	Ranunculaceae
	<i>Pulsatilla vulgaris</i>	Ranunculaceae
<i>Urocystis radiculicola</i>	<i>Ranunculus arvensis</i>	Ranunculaceae
<i>Urocystis ranunculi</i>	<i>Ranunculus acris</i>	Ranunculaceae
	<i>Ranunculus aduncus</i>	Ranunculaceae
	<i>Ranunculus alpestris</i>	Ranunculaceae
	<i>Ranunculus arvensis</i>	Ranunculaceae
	<i>Ranunculus brevifolius</i>	Ranunculaceae
	<i>Ranunculus bulbosus</i>	Ranunculaceae
	<i>Ranunculus carpaticus</i>	Ranunculaceae
	<i>Ranunculus cortusifolius</i>	Ranunculaceae
	<i>Ranunculus creticus</i>	Ranunculaceae
	<i>Ranunculus glacialis</i>	Ranunculaceae
	<i>Ranunculus grenieranus</i>	Ranunculaceae
	<i>Ranunculus hyperboreus</i>	Ranunculaceae
	<i>Ranunculus montanus</i>	Ranunculaceae
	<i>Ranunculus nemerosus</i>	Ranunculaceae
	<i>Ranunculus oreophilus</i>	Ranunculaceae
	<i>Ranunculus oxyspermus</i>	Ranunculaceae
	<i>Ranunculus paludosus</i>	Ranunculaceae
	<i>Ranunculus pedatus</i>	Ranunculaceae
	<i>Ranunculus platanifolius</i>	Ranunculaceae
	<i>Ranunculus polyanthemus</i>	Ranunculaceae
	<i>Ranunculus pseudomontanus</i>	Ranunculaceae
<i>Ranunculus repens</i>	Ranunculaceae	
<i>Ranunculus rupestris</i>	Ranunculaceae	

	<i>Ranunculus sardous</i>	Ranunculaceae
<i>Urocystis ranunculi-auricomi</i>	<i>Ranunculus auricomus</i>	Ranunculaceae
<i>Urocystis ranunculi-bullati</i>	<i>Ranunculus bullatus</i>	Ranunculaceae
<i>Urocystis roivainenii</i>	<i>Anthoxanthum odoratum</i>	Poaceae
<i>Urocystis schizocaulon</i>	<i>Odontites lutea</i>	Orobanchaceae
<i>Urocystis scillae</i>	<i>Scilla autumnalis</i>	Asparagaceae
	<i>Scilla bifolis</i>	Asparagaceae
<i>Urocystis secalis-silvestris</i>	<i>Secale sylvestris</i>	Poaceae
<i>Urocystis sorosporioides</i>	<i>Thalictrum alpinum</i>	Ranunculaceae
	<i>Thalictrum aquilegifolium</i>	Ranunculaceae
	<i>Thalictrum flavum</i>	Ranunculaceae
	<i>Thalictrum foetidum</i>	Ranunculaceae
	<i>Thalictrum minus</i>	Ranunculaceae
	<i>Thalictrum simplex</i>	Ranunculaceae
<i>Urocystis sternbergiae</i>	<i>Sternbergia colchiciflora</i>	Amaryllidaceae
<i>Urocystis syncocca</i>	<i>Hepatica acutiloba</i>	Ranunculaceae
	<i>Hepatica nobilis</i>	Ranunculaceae
	<i>Hepatica transsilvanica</i>	Ranunculaceae
	<i>Hepatica triloba</i>	Ranunculaceae
<i>Urocystis tesellata</i>	<i>Agrostis capillaris</i>	Poaceae
	<i>Agrostis stolonifera</i>	Poaceae
<i>Urocystis tothii</i>	<i>Juncus compressus</i>	Juncaceae
<i>Urocystis trientalis</i>	<i>Trientalis europaea</i>	Myrsinoideae
<i>Urocystis triseti</i>	<i>Trisetum alpestre</i>	Poaceae
	<i>Trisetum flavescens</i>	Poaceae
	<i>Trisetum spicatum</i>	Poaceae
<i>Urocystis tritici</i>	<i>Triticum aestivum</i>	Poaceae
<i>Urocystis trollii</i>	<i>Trollius asiaticus</i>	Ranunculaceae
	<i>Trollius chinensis</i>	Ranunculaceae
	<i>Trollius europaeus</i>	Ranunculaceae
	<i>Trollius hybridus</i>	Ranunculaceae
	<i>Trollius patulus</i>	Ranunculaceae
<i>Urocystis ulei</i>	<i>Festuca arundinacea</i>	Poaceae
	<i>Festuca ovina</i>	Poaceae
	<i>Festuca paniculata</i>	Poaceae
	<i>Festuca pratensis</i>	Poaceae
	<i>Festuca pseudovina</i>	Poaceae
	<i>Festuca valesiaca</i>	Poaceae
<i>Urocystis ulmariae</i>	<i>Filipendula ulmaria</i>	Rosaceae
<i>Urocystis violae</i>	<i>Viola alba</i>	Violaceae
	<i>Viola ambigua</i>	Violaceae
	<i>Viola biflora</i>	Violaceae
	<i>Viola canina</i>	Violaceae
	<i>Viola collina</i>	Violaceae
	<i>Viola cornuta</i>	Violaceae

<i>Viola elatior</i>	Violaceae
<i>Viola hirta</i>	Violaceae
<i>Viola lutea</i>	Violaceae
<i>Viola mirabilis</i>	Violaceae
<i>Viola odorata</i>	Violaceae
<i>Viola persicifolia</i>	Violaceae
<i>Viola pumila</i>	Violaceae
<i>Viola reichenbachiana</i>	Violaceae
<i>Viola riviniana</i>	Violaceae
<i>Viola suavis</i>	Violaceae
<i>Viola sylvestris</i>	Violaceae

Anhang 8: Korrelation Sporenkategorie und Wirtszugehörigkeit bei der Gattung *Urocystis*

Spezies	fertile Sporen	Sporen-Kat	Familie	Gruppe
<i>Urocystis agropyri</i>	1-3(-5)	1	Poaceae	1-1
<i>Urocystis alopecuri</i>	1-3	1	Poaceae	1-1
<i>Urocystis avenastri</i>	1-4(-5)	2	Poaceae	1-1
<i>Urocystis beckmannia</i>	1-2(-3)	1	Poaceae	1-1
<i>Urocystis bolivari</i>	1-6	2	Poaceae	1-1
<i>Urocystis bromi</i>	1-4	2	Poaceae	1-1
<i>Urocystis hierochloe</i>	1-4(-5)	2	Poaceae	1-1
<i>Urocystis poae</i>	1-2(-4)	1	Poaceae	1-1
<i>Urocystis triseti</i>	1-6	2	Poaceae	1-1
<i>Urocystis ulei</i>	1-2(-3)	1	Poaceae	1-1
<i>Urocystis bulbocodii</i>	1-5(-9)	2	Liliaceae	1-2
<i>Urocystis colchici</i>	1-3(-4)	1	Liliaceae	1-2
<i>Urocystis junci</i>	1-20	4	Juncaceae	1-3
<i>Urocystis luzulae</i>	1-7(-12)	3	Juncaceae	1-3
<i>Urocystis anemomes</i>	1-3	1	Ranunculaceae	2-1
<i>Urocystis eranthidis</i>	1-2(-3)	1	Ranunculaceae	2-1
<i>Urocystis ficariae</i>	1-3(-4)	1	Ranunculaceae	2-1
<i>Urocystis floccosa</i>	1-3(-4)	1	Ranunculaceae	2-1
<i>Urocystis pulsatile</i>	1-5	2	Ranunculaceae	2-1
<i>Urocystis ranunculi</i>	1-3(-5)	1	Ranunculaceae	2-1
<i>Urocystis irregularis</i>	1-7(-9)	3	Ranunculaceae	2-2
<i>Urocystis syncocca</i>	1-8(-9)	3	Ranunculaceae	2-2
<i>Urocystis corsica</i>	(3-)6-15(-20?)	4	Poaceae	
<i>Urocystis ornithogalli</i>	1-3(4)	1	Liliaceae	
<i>Urocystis alstroemeria</i>	(0-)1-4(-6)	2	Alstroemeriaceae	
<i>Urocystis miyabeana</i>	1-3(-4)	1	Ruscaceae	
<i>Urocystis galanthii</i>	1-3(-4)	1	Amaryllidaceae	
<i>Urocystis trollii</i>	(1-)2-5(-8)	2	Ranunculaceae	
<i>Urocystis trientalis</i>	6-50	6	Primulaceae	
<i>Urocystis primulae</i>	(1-)3-15	5	Primulaceae	
<i>Urocystis occulta</i>	1-3(-5)	1	Poaceae	
<i>Urocystis orobanches</i>	1-2(-3)	1	Orobanchaceae	

9 Danksagung

Zuallererst möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Dominik Begerow für die Bereitstellung dieses faszinierenden Themas bedanken. Weiter sei gedankt für die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit, welche so manchen „Lotze-Engelhard“ enthielt der zurechtgerückt werden musste.

Meinem Koreferenten Herrn Prof. Dr. Ralph Tollrian sei gedankt für das Zweitgutachten dieser Arbeit.

Dr. Martin Kemler möchte ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Urocystis-Jagd sowie der exzellenten Einführung in die Bioinformatik danken.

Des weiteren möchte ich mich Bedanken bei,

Dr. Angela Schäfer für die super Betreuung von „unserem“ ersten S-Block und ihrer Wegbegleitung in den letzten drei Jahren.

Ronny Kellner für die Einführung ins Primerdesign, wertvollen Tipps im Labor, Erfahrungsaustausch in „Con-Angelegenheiten und der Wiederbeschaffung zweier TNG's.

Dr. Andrey Yurkov für die Einführung in die Welt der Hefen.

Ilse Wessel, die im Labor, vor allem bei der Materialbeschaffung, eine Hilfe war.

Dr. Wolfgang Maier, für sein sonnigen Wesen, das immer wieder für Laune sorgt.

Sabine Kühle für die Organisation in Hintergrund.

Arthur Schmed, der in den Achtzigerjahren die erste vollautomatische Kaffeemaschine für den Haushalt baute und von dessen Erfindung ich in den letzten Wochen mehr als sonst habe profitiert habe.

Allen weiteren Studenten und Kollegen in der AG für den alltäglichen Wahnsinn ☺

Zum Schluss für ein paar ganz besondere Menschen mein ganz besonderer Dank.

Meiner Frau Anke, die meinen Weg seit mittlerweile 10 Jahren begleitet und ebnet. Die in letzter Zeit bestimmt viele Nerven gebraucht hat, um mich und mein Kauderwelsch zu ertragen und mir immer wieder Mut zugesprochen hat.

Sonja für die sehr enge Freundschaft, die mir in letzter Zeit sehr geholfen hat und das Frühstück.

Meinen Großeltern, die mir den Weg ins und durch das Studium geebnet haben und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

10 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die heute eingereichte Diplomarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie Zitate kenntlich gemacht habe. Bei der vorliegenden Diplomarbeit handelt es sich um vier in Wort und Bild völlig übereinstimmende Exemplare.

Weiterhin erkläre ich, dass digitale Abbildungen nur die originalen Daten enthalten und in keinem Fall inhaltsverändernde Bildbearbeitung vorgenommen wurde.

Betreuer der Arbeit war: Prof. Dr. Dominik Begerow

Als Korreferenten schlage ich vor: Prof. Dr. Ralph Tollrian

Bochum, den

.....

Sascha Lotze-Engelhard