

Lehrstuhl für Phytopathologie
der Technischen Universität München

Molekularbiologische Differenzierung parasitischer Nematoden aus der Familie der Longidoridae in Weinbaulagen und ihre Phylogenie

Judith Hübschen

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. W. Huber
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. V. Zinkernagel (i.R.)
2. Univ.-Prof. Dr. G. Forkmann

Die Dissertation wurde am 18.12.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 29.03.2004 angenommen.

Danksagungen / Acknowledgements

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Volker Zinkernagel, der sich - trotz Ruhestand - bereiterklärt hat, die universitäre Betreuung vorliegender Arbeit zu übernehmen.

Herrn Prof. Dr. Forkmann danke ich für seine Bereitschaft, Zweitprüfer der Arbeit zu werden und Herrn Prof. Dr. Huber für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ferner bin ich Frau Dr. Ulrike Ipach - der Inhaberin des Forschungsprojektes - zu Dank verpflichtet, die mir die Möglichkeit gegeben hat, dieses Thema zu bearbeiten.

I am very grateful to Dr. Roy Neilson who was an excellent supervisor and adviser throughout the whole period of my PhD and to Prof. Dr. Derek J.F. Brown who made the cooperation between SCRI and SLFA possible and gave many helpful hints.

Ein ganz besonders herzliches Dankeschön geht an meine beiden Kolleginnen und "Rundumbetreuerinnen" Frau Lilo Kling und Frau Brigitte Helmstätter für ihren fachlichen und seelischen Beistand, für all die hilfreichen Tipps und für so manches aufbauende Wort.

Furthermore I owe many thanks to Dr. Konstantina Boutsika who patiently guided my first steps in molecular biology working techniques and to C. Marcelo G. Oliveira for providing help and information in many different situations.

For most of the time (and if not it was not her fault!) excellent sequencing results, for helpful suggestions and her patience in explaining things to me, I would like to thank Clare McQuade.

Vielen Dank auch an die Adresse von Herrn Dr. Thierry Wetzel für viele hilfreiche Tipps und Informationen nach meiner Rückkehr nach Neustadt und für die ständige Diskussionsbereitschaft. Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Ann-Kristin Jung, die nicht nur immer dann zur Stelle war, wenn EDV- und sonstige Probleme auftraten, sondern die auch auf vielfältige Weise zu meiner Erheiterung beigetragen hat.

I am grateful to Dr. Frank Wright for his help with the phylogenetic analysis of my data and to Sheena Lamond who not only organized nematodes, but also accommodation and flights home for me and who gave me some really good tips for weekend activities.

Mein Dank gilt außerdem Frau Doris Dersch-Fischer, die mir mehrere Male erspart hat, selbst den Autoklaven anzuheizen und Frau Irene Johann, die mir einige der Materialbestellungen abgenommen hat und eine kompetente Ansprechpartnerin bei allen chemischen Fragestellungen war. Ferner ein Dankeschön an Herrn Christian Hachenberg, Herrn Dominik Hagenbuch und Herrn Martin Sauerhöfer, die sich um unsere Pflanzen und Gewächshaus-Nematodenzuchten gekümmert haben, sowie an Herrn Bernhard Kaiser, der bei allen Computerproblemen hilfreich zur Seite stand.

A very hearty thank you to Gill Ellis for always reminding me to work hard and for showing me together with her husband Roger that generosity and hospitality are more than just words.

Many thanks to Anne Holt and Alison Patterson who tried to familiarize me with the particularities of "Scottish English" and who together with Ailsa, Jane, Rodula, Maria, Katka, Cleber, Qing and some of the above mentioned made my time in Scotland such a marvellous one.

Auf keinen Fall versäumen möchte ich, meine Dankbarkeit all denjenigen Winzern auszusprechen, die mit ihren Abgaben/Beiträgen an die WAK/Kammer diese Arbeit finanziert haben.

Und schließlich ein ganz besonders herzliches Dankeschön an meine ganze Familie, die mich trotz all meiner seltsamen Anwendungen (Studieren, Doktorarbeit....) immer unterstützt und mir erlaubt hat, daheim wieder neue Kraft und Energie zu sammeln.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	VII
1. Einleitung und Literaturübersicht	1
1.1 Einleitung und Problemstellung	1
1.2 Virusübertragende Nematoden	3
1.2.1 Familie Longidoridae	5
1.2.1.1 Geschichtlicher Rückblick und Taxonomie	5
1.2.1.2 Allgemeine Morphologie	6
1.2.1.3 Lebensweise	6
1.2.2 Virusvektoren im deutschen Weinbau und verwandte Nichtüberträgerarten	8
1.2.2.1 <i>Longidorus attenuatus</i>	8
1.2.2.2 <i>Longidorus elongatus</i>	9
1.2.2.3 <i>Longidorus macrosoma</i>	10
1.2.2.4 <i>Paralongidorus maximus</i>	11
1.2.2.5 <i>Xiphinema diversicaudatum</i>	11
1.2.2.6 <i>Xiphinema index</i>	12
1.2.2.7 Weitere Longidoriden in Weinbergsböden	14
1.3 Nepoviren	15
1.3.1 Virusübertragung	16
1.3.2 Symptome der Reisigkrankheit bei Reben	16
1.4 Molekularbiologische Diagnosemethoden	18
1.4.1 Allgemein	18
1.4.2 rDNA	18
1.4.3 18S-Gen	19
1.4.4 ITS1-Region	20
1.5 Evolution	20
1.6 Phylogenie	21

2. Material und Methoden	23
2.1 Sequenzierung des 18S-Genes und Analyse der Daten (durchgeführt am SCRI)	23
2.1.1 Material	23
2.1.1.1 Nematoden	23
2.1.1.2 Primer	25
2.1.2 Methoden	26
2.1.2.1 DNA-Extraktion	27
2.1.2.2 PCR	27
2.1.2.3 Gelelektrophorese	28
2.1.2.4 Reinigung der PCR-Produkte	29
2.1.2.5 Sequenzierung	29
2.1.2.6 Präzipitation der DNA	30
2.1.2.7 Sequenzdatenanalyse	30
2.1.2.8 Phylogenetische Analyse	31
2.2 Sequenzierung der ITS1-Region und Primerkonstruktion	32
2.2.1 Material	32
2.2.1.1 Nematoden	32
2.2.1.2 Primer	33
2.2.2 Methoden	33
2.2.2.1 Extraktion der Nematoden aus Bodenproben bzw. aus den Zuchtansätzen	33
2.2.2.2 Nematodenidentifikation	34
2.2.2.3 DNA-Extraktion	40
2.2.2.4 PCR	40
2.2.2.5 Gelelektrophorese	40
2.2.2.6 Reinigung der PCR-Produkte	41
2.2.2.7 Sequenzierung	42
2.2.2.8 Präzipitation der DNA	42
2.2.2.9 Sequenzdatenanalyse	42
2.2.2.10 Primerdesign	43
2.3 Testung der Primer	44
2.3.1 Testung der von WANG <i>et al.</i> (2003) entwickelten <i>Xiphinema</i> -Primer	44
2.3.1.1 Nachweissicherheit	44
2.3.1.2 Spezifität	45

2.3.1.3	Sensitivität	45
2.3.2	Testung der <i>Longidorus</i> - und <i>Paralongidorus</i> -Primer	47
2.3.2.1	Nachweissicherheit, Spezifität und Sensitivität	47
2.3.2.2	Anpassung der PCR-Bedingungen und Möglichkeiten des Multiplexing	48
2.3.3	Einsatz der Primer in der Praxis	48
3.	Ergebnisse	49
3.1	Sequenzierung des 18S-Genes	49
3.1.1	Nematoden	49
3.1.2	PCR-Produkte	49
3.1.3	Sequenzierung	51
3.1.4	Sequenzdatenanalyse	52
3.1.4.1	Allgemein	52
3.1.4.2	Virusüberträger im deutschen Weinbau	53
3.1.4.3	Vergleich zwischen einigen Virusüberträgern und morphologisch ähnlichen Arten	62
3.1.5	Phylogenetische Analyse	63
3.1.5.1	Analyse der Virusvektoren	64
3.1.5.2	Analyse der Virusvektoren zusammen mit weiteren Arten aus Weinbergsböden	64
3.1.5.3	Analyse der 42 Longidoridae-Arten	66
3.2	Sequenzierung der ITS1-Region und Primerkonstruktion	68
3.2.1	Nematoden	68
3.2.2	Zuverlässigkeit der DNA-Extraktion	68
3.2.3	PCR-Produkte	68
3.2.4	Sequenzierung	70
3.2.5	Sequenzdatenanalyse	70
3.2.6	Primerkonstruktion	72
3.3	Primertestungen	73
3.3.1	Testung der von WANG <i>et al.</i> (2003) entwickelten <i>Xiphinema</i> -Primer	73
3.3.1.1	Nachweissicherheit	73
3.3.1.2	Spezifität	73
3.3.1.3	Sensitivität	74
3.3.2	Testung der <i>Longidorus</i> - und <i>Paralongidorus</i> -Primer	76

3.3.2.1	Nachweissicherheit, Spezifität und Sensitivität	76
3.3.2.2	Anpassung der PCR-Bedingungen und Möglichkeiten des Multiplexing	80
3.3.3	Praxiseinsatz	81
4.	Diskussion	83
4.1	Methodik	83
4.1.1	DNA-Extraktion	83
4.1.2	PCR und Gelelektrophorese	84
4.2	Sequenzierung des 18S-Genes	84
4.2.1	Sequenzdatenanalyse allgemein	84
4.2.2	Sequenzdatenanalyse der Virusüberträger im deutschen Weinbau und verwandter Arten	85
4.2.3	Phylogenetische Analyse	87
4.2.4	Eignung des 18S-Genes für Diagnostik bzw. Phylogenie	88
4.3	Sequenzierung der ITS1-Region und Primerkonstruktion	89
4.3.1	Nematodenidentifikation	89
4.3.2	PCR-Produkte	90
4.3.3	Sequenzdatenanalyse	93
4.3.4	Primerkonstruktion	96
4.3.5	Eignung der ITS1-Region für diagnostische Zwecke bzw. für phylogenetische Analysen	98
4.4	Primertestungen	99
4.4.1	Nachweissicherheit, Spezifität und Sensitivität	99
4.4.2	PCR-Bedingungen und Multiplexing	100
4.4.3	Möglichkeiten des Praxiseinsatzes und Bewertung der Nachweismethode	101
4.5	Ausblick	102
5.	Zusammenfassung	104
6.	Literaturverzeichnis	106
7.	Liste der aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangenen Veröffentlichungen	123
8.	Anhang	125

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
A	Adenin
AFLP	<i>amplified fragment length polymorphism</i>
ArMV	<i>Arabidopsis Mosaic Virus</i>
BBA	Biologische Bundesanstalt
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C.	<i>Caenorhabditis</i>
ca.	<i>circa</i>
cm	Zentimeter
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> (und andere)
ETS	<i>external transcribed spacer</i>
g	Gramm
G	Guanin
GCG	<i>Genetics Computer Group</i>
GFLV	<i>Grapevine Fanleaf Virus</i>
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
Inc.	<i>Incorporation</i>
ITS	<i>internal transcribed spacer</i>
kb	Kilobasen
L.	<i>Longidorus</i>
Ltd.	<i>Limited</i>
m	Meter
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mtDNA	mitochondriale DNA
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
nt	Nukleotide
NTS	<i>non-transcribed spacer</i>

<i>P.</i>	<i>Paralongidorus</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	potentia Hydrogenii (Wirksamkeit des Wasserstoffes)
PHYLIP	<i>PHYLogeny Inference Package</i>
RAPD	<i>randomly amplified polymorphic DNA</i>
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
RFLP	Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RpRSV	<i>Raspberry Ringspot Virus</i>
rRNA	ribosomale RNA
SCRI	<i>Scottish Crop Research Institute</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SLRSV	<i>Strawberry Latent Ringspot Virus</i>
sp.	<i>species</i> (Art)
spp.	<i>species</i> (Arten)
SSU	<i>small subunit</i>
T	Thymin
TBE	Tris-Borsäure-Puffer mit EDTA
TBRV	<i>Tomato Black Ring Virus</i>
TE	Tris-HCl-Puffer mit EDTA
TM	<i>Trademark</i>
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
USA	United States of America
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
<i>X.</i>	<i>Xiphinema</i>
z.B.	zum Beispiel

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

1.1	Systematische Einordnung von virusübertragenden Nematoden	3
1.2	Reisigkrankheit bei Traminer, Befallsherd	17
1.3	Reisigkrankheit bei Heroldrebe	17
1.4	Schematischer Aufbau einer rDNA-Einheit	19
2.1	Ungefähre Anlagerungspositionen und Amplifikationsrichtungen der Primer aus Tabelle 2.3	26
2.2	1 kb DNA-Marker (Promega)	28
2.3	Ungefähre Anlagerungsstellen und Amplifikationsrichtungen der beiden Primer aus Tabelle 2.7	33
2.4	Vordere Körperregion der Longidoridae-Gattungen <i>Longidorus</i> , <i>Paralongidorus</i> und <i>Xiphinema</i>	35
2.5	100bp DNA-Marker (GIBCO BRL)	41
3.1	Gelelektrophorese der PCR-Produkte von zwei verschiedenen <i>Xiphinema</i> -Populationen	50
3.2	Gelelektrophorese der PCR-Produkte von zwei <i>Longidorus</i> -Arten	50
3.3	Zusammenlagerung von einzelnen Sequenzfragmenten mit Hilfe des GCG-Software-Paketes zu einem Gesamtkonsensus am Beispiel einer <i>Longidorus</i> -Herkunft	51
3.4	Vergleich der Basenzusammensetzung (in %) innerhalb des 18S-Genes zwischen den sechs Virusvektorarten im deutschen Weinbau	61
3.5	Konsensusstammbaum der sechs Virusvektorarten mit <i>Mononchus aquaticus</i> als „outgroup“	64
3.6	Konsensusstammbaum von zehn in Weinbergserde vorkommenden Longidoridae-Arten mit <i>Mononchus aquaticus</i> als „outgroup“	65
3.7	Konsensusstammbaum von insgesamt 42 Longidoridae-Arten mit <i>Mononchus aquaticus</i> als „outgroup“	67
3.8	Gelelektrophorese der PCR-Produkte der sieben Nematodenarten mit der Primerkombination B118/RN58SR	69
3.9	Zusammenlagerung der Sequenzfragmente von insgesamt sechs Einzeltieren mit Hilfe der SeqManII-Anwendung des Lasergene-Programmpaketes zu einem Gesamtkonsensus am Beispiel von <i>L. elongatus</i>	70
3.10	Beispiel für eine Gelelektrophorese mit den spezifischen Primern für <i>X. index</i> , <i>X. vuittenezi</i> und <i>X. diversicaudatum</i>	73
3.11	Gelelektrophorese von <i>X. index</i> und <i>X. vuittenezi</i> mit artspezifischen Primern und <i>L. elongatus</i> -DNA mit dem Primerpaar für <i>X. index</i>	74
3.12	Gelelektrophorese der DNA-Mischungen 9, 11, 13, 14, 15, 17 und 18 aus Tabelle 2.14 mit jeweils allen drei <i>Xiphinema</i> -Primern	74
3.13	Elektrophorese der Proben 5-8 aus Tabelle 2.15 mit jeweils allen drei <i>Xiphinema</i> -Primern	75
3.14	Elektrophorese der PCR-Produkte zum Nachweis von <i>X. index</i> und <i>X. diversicaudatum</i> unter ganzen Nematodengemeinschaften mit Hilfe von artspezifischen Primern	76

3.15	Elektrophorese der Amplifikationsprodukte von DNA von sieben verschiedenen Longidoridae-Arten mit den Primern aus Tabelle 3.13	77
3.16	Nachweis von virusübertragenden Longidoriden unter gesamten Nematodengemeinschaften	78
3.17	Nachweis verschiedener Populationen einer Art mit Hilfe der Primerkombinationen aus Tabelle 3.14	79
3.18	Möglichkeiten des Multiplexing mit den Primern aus Tabelle 3.13	81

Tabellen

1.1	Virusvektoren aus der Familie Longidoridae und die von ihnen übertragenen Nepoviren	4
2.1	Herkünfte unterschiedlicher Populationen der drei Nematodenarten <i>X. diversicaudatum</i> , <i>X. index</i> und <i>X. vuittenezi</i>	23
2.2	Untersuchte Populationen der zu den Gattungen <i>Longidorus</i> , <i>Paralongidorus</i> und <i>Xiphinema</i> gehörenden Nematodenarten	24
2.3	Zur Sequenzierung des 18S-Genes verwendete Primer, deren Länge, Sequenzen und Amplifikationsrichtungen	25
2.4	PCR-Bedingungen	28
2.5	Bedingungen für Sequenzierungs-PCR	30
2.6	Zur Sequenzierung eingesetzte Nematoden und deren Herkünfte	32
2.7	Länge, Sequenzen und Amplifikationsrichtungen der zur Sequenzierung der ITS1-Region verwendeten Primer	33
2.8	Merkmale zur Unterscheidung der Gattungen <i>Longidorus</i> , <i>Paralongidorus</i> und <i>Xiphinema</i>	35
2.9	Unterscheidungsmerkmale der virusübertragenden <i>Longidorus</i> - und <i>Paralongidorus</i> -Arten	37
2.10	Unterscheidungsmerkmale der virusübertragenden <i>Xiphinema</i> -Arten	38
2.11	Charakteristika von vier Nicht-Virusvektoren aus der Familie Longidoridae	39
2.12	Herkünfte von <i>Xiphinema diversicaudatum</i> , <i>X. index</i> und <i>X. vuittenezi</i> zur Testung der von WANG <i>et al.</i> (2003) entwickelten Primer	44
2.13	Zur Testung der <i>Xiphinema</i> -Primer eingesetzte Nematodenherkünfte	45
2.14	DNA-Mischungen zur Ermittlung der Primersensitivität	46
2.15	Zur gemeinsamen DNA-Extraktion verwendete Nematoden	46
3.1	Verwendete Primerpaare und Länge der zugehörigen PCR-Produkte	51
3.2	Anzahl der Unterschiede im 18S-Gen zwischen den Virusüberträgern im deutschen Weinbau bei gemeinsamem Start- und Endpunkt der Sequenzen	54
3.3	Anzahl, Position und Art der Unterschiede zwischen <i>X. diversicaudatum</i> (XD) und <i>X. index</i> (XI) im 18S-Gen	55
3.4	Anzahl, Position und Art der Unterschiede zwischen <i>L. attenuatus</i> (LA) und <i>L. elongatus</i> (LE) im 18S-Gen	55
3.5	Anzahl, Position und Art der Unterschiede zwischen <i>L. attenuatus</i> (LA) und <i>L. macrosoma</i> (LM) im 18S-Gen	56
3.6	Anzahl, Position und Art der Unterschiede zwischen <i>L. elongatus</i> (LE) und <i>L. macrosoma</i> (LM) im 18S-Gen	57
3.7	Position und Anzahl gattungsspezifischer Muster im 18S-Gen bei den sechs Virusvektorarten im deutschen Weinbau	59
3.8	Anzahl der einzelnen Basen, sowie GC- und AT-Gehalt im 18S-Gen	60

3.9	Anzahl, Position und Art der Unterschiede zwischen <i>X. index</i> (XI) und <i>X. vuittenezi</i> (XV) im 18S-Gen	62
3.10	Anzahl, Position und Art der Unterschiede zwischen <i>L. elongatus</i> (LE) und <i>L. sturhani</i> (LS) im 18S-Gen	63
3.11	Nematodenarten und Länge der zugehörigen PCR-Produkte bei Verwendung der Primer B118 und RN58SR	69
3.12	Gesamtlänge der ermittelten Sequenzdaten für die 10 Longidoridae-Arten	71
3.13	Spezifische Primer zum Nachweis von Virusvektoren im deutschen Weinbau und verwandten Nematodenarten	72
3.14	Spezifische Fragmentgrößen bei Verwendung der neu entwickelten Primer	77

1. Einleitung und Literaturübersicht

1.1 Einleitung und Problemstellung

In deutschen Weinbergböden kommt eine Vielzahl von pflanzenparasitären Nematoden vor. Einige dieser Arten zählen zu den Direktschädigern, d. h. sie verursachen durch ihre Saugtätigkeit unmittelbare Schäden in Form von Gallen, Kümmerwuchs bis hin zum Absterben von Pflanzen. Diese Art der Schädigung spielt jedoch im deutschen Weinbau kaum eine Rolle, da die hier erreichten Populationsdichten zu gering sind, um schwerwiegende Wuchsdepressionen an Reben hervorrufen zu können (RÜDEL, 1975). Von wesentlich größerer Bedeutung sind die durch Nematoden hervorgerufenen Sekundärschäden, wozu das Schaffen von Eintrittspforten für Krankheitserreger wie Pilze und Bakterien ebenso zählt, wie die Übertragung von Viren. Die wirtschaftlich wichtigste Rebvirose ist der Komplex der Reisigkrankheit, deren Symptome von verschiedenen nematodenübertragbaren Viren ausgelöst werden. Als Vektoren kommen dabei insgesamt sechs Nematodenarten aus der Familie der Longidoridae in Frage.

Um die Erzeugung gesunden Rebmaterials zu gewährleisten, wird im Rahmen der Gesundheitsselektion eine Virustestung vorgenommen. Daneben muss laut Rebenpflanzgutverordnung sichergestellt werden, dass Böden von Vermehrungsanlagen frei von virusübertragenden Nematoden sind, um so der Gefahr einer Neuinfektion vorzubeugen.

Da es seit 1988 keine direkten Bekämpfungsmöglichkeiten gegen Nematoden im Weinbau mehr gibt (RÜDEL, 1987, 1988), kommt einer genauen und vor allem verlässlichen Bestimmung der Arten eine besondere Bedeutung zu, denn anhand eines Bodengutachtens wird entschieden, ob eine Fläche zur Rebvermehrung genutzt werden darf oder nicht.

Bis vor kurzem konnte eine sichere Identifizierung der virusübertragenden Nematodenarten nur anhand von morphologischen Merkmalen bei adulten Tieren vorgenommen werden. Bei Bodenuntersuchungen finden sich jedoch manchmal ausschließlich Larvenstadien, oft liegen Mischpopulationen mehrerer Arten und niedrige Populationsdichten vor. Erschwerend kommt noch hinzu, dass neben den Vektoren mehrere morphologisch ähnliche Nichtvektorarten aus der gleichen Familie in Weinbergböden anzutreffen sind.

Aus diesen Gründen ist es wünschenswert, eine Methode zur Verfügung zu haben, die eine sichere Artdifferenzierung unabhängig von dem Entwicklungsstadium, in Mischpopulationen und auch bei Vorliegen eines einzelnen Nematoden möglich macht. Aufgrund der beachtli-

chen Fortschritte im Bereich der Molekularbiologie innerhalb der letzten Jahre, scheint sich ein hierauf beruhendes Verfahren anzubieten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher zunächst einmal die Untersuchung des 18S-Genes der rDNA der beiden Virusvektorarten *Xiphinema diversicaudatum* und *X. index*, sowie der morphologisch ähnlichen Art *X. vuittenezi*. Es sollte festgestellt werden, ob innerhalb der Arten bzw. zwischen ihnen Unterschiede in diesem Genbereich vorliegen und falls ja, ob die interspezifische Variation zur Entwicklung eines molekularen Diagnoseverfahrens ausreicht. Ferner war von Interesse, zu überprüfen, welche Variabilität innerhalb der übrigen beiden Gattungen mit Virusvektoren, *Longidorus* und *Paralongidorus*, vorliegt und wie konserviert die 18S-Gen-Sequenzen zwischen den einzelnen Gattungen innerhalb einer Familie sind. Von daher wurde eine große Anzahl an Nematodenpopulationen aus diesen drei Gattungen sequenziert. Die gewonnenen Daten sollten dann einer phylogenetischen Analyse unterworfen werden, um die Verwandtschaftsbeziehungen insbesondere der Virusüberträger im deutschen Weinbau und morphologisch ähnlicher Arten aufzuklären.

Neben der Aufklärung und Analyse der molekularen Unterschiede zwischen den Testorganismen bestand das Hauptziel der Arbeit in der Entwicklung eines verlässlichen Diagnosesystems und so wurde zusätzlich zum 18S-Gen die daran angrenzende ITS1-Region untersucht. Es sollte eine möglichst einfache und praxisnahe Methode zur Identifikation von Virusvektornematoden im deutschen Weinbau etabliert werden. Deshalb wurde trotz der bereits vielfach erfolgreich angewandten ITS-RFLP-Technik die Entwicklung spezifischer Primer angestrebt, da hier das Ergebnis bereits in der Gelelektrophorese der PCR-Produkte abgelesen werden kann und kein Einsatz von Restriktionsenzymen mehr nötig ist. Während des Verlaufs dieser Arbeit stellte sich heraus, dass es einer französischen Arbeitsgruppe bereits gelungen war, spezifische Primer für die drei Arten *Xiphinema diversicaudatum*, *X. index* und *X. vuittenezi* zu entwickeln (WANG *et al.*, 2003). Die eigenen Bemühungen in diese Richtung wurden daraufhin unterbrochen und stattdessen untersucht, ob dieses molekulare Diagnoseverfahren auch für den sicheren Nachweis deutscher Nematodenpopulationen eingesetzt werden kann. Zudem sollte eine ähnliche Identifikationsmethode für die übrigen vier Virusvektorarten erarbeitet werden.

Die gewonnenen ITS1-Daten sollten ebenfalls einer phylogenetischen Analyse zugeführt und der entstehende Stammbaum mit dem aus den 18S-Daten gewonnenen verglichen werden.

1.2 Virusübertragende Nematoden

Der Stamm Nematoda umfasst derzeit rund 20000 Arten, etwa 4000 davon sind Pflanzenparasiten (WEISCHER und BROWN, 2000). Innerhalb dieser Gruppe wiederum befinden sich zwei Ordnungen, die virusübertragende Nematodenarten enthalten. In der Ordnung Dorylaimida sind dies Vertreter der drei Gattungen *Longidorus*, *Paralongidorus* und *Xiphinema*, die alle zur Familie der Longidoridae gehören und bei den Triplonchida Mitglieder der Familie Trichodoridae aus den Gattungen *Paratrichodorus* und *Trichodorus* (Abbildung 1.1).

Derzeit sind acht *Paratrichodorus*- und vier *Trichodorus*-Arten als Vektoren von insgesamt drei verschiedenen Tobraviren bekannt (TAYLOR und BROWN, 1997). Diese Viren (tobacco rattle (TRV), pea early-browning (PEBV) und pepper ringspot (PRV)) wurden ursprünglich als Netuviren (nematode-transmitted viruses with tubular particles) bezeichnet (TAYLOR und BROWN, 1997). Dem gegenüber stehen die sogenannten Nepoviren (nematode-transmitted viruses with polyhedral particles) (CADMAN, 1963), von deren 37 Arten bei nur rund einem Drittel tatsächlich auch eine Übertragung durch Nematoden nachgewiesen werden konnte (TAYLOR und BROWN, 1997). Alle hierfür in Frage kommenden Vektoren gehören zur Familie Longidoridae (Tabelle 1.1).

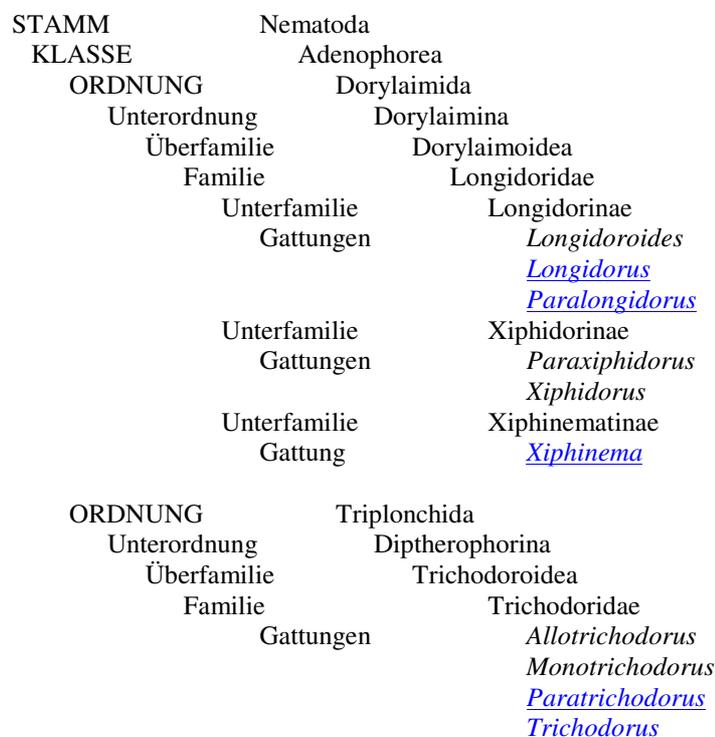


Abb. 1.1: Systematische Einordnung von virusübertragenden Nematoden (nach HUNT, 1993, TAYLOR und BROWN, 1997 und WEISCHER und BROWN, 2000)

Tab. 1.1: Virusvektoren aus der Familie Longidoridae und die von ihnen übertragenen Nepoviren (nach TAYLOR und BROWN, 1997)

Vektornematode	Virus	Kurzbezeichnung	Stamm
Longidorus			
<i>L. apulus</i>	Artichoke Italian latent	AILV	Italienischer
<i>L. arthensis</i>	Cherry rosette	CRV	
<i>L. attenuatus</i>	Tomato black ring	TBRV	Englischer Deutscher
<i>L. diadecturus</i>	Peach rosette mosaic	PRMV	
<i>L. elongatus</i>	Raspberry ringspot	RpRSV	Schottischer
	Tomato black ring	TBRV	Schottischer
<i>L. fasciatus</i>	Artichoke Italian latent	AILV	Griechischer
<i>L. macrosoma</i>	Raspberry ringspot	RpRSV	Englischer
<i>L. martini</i>	Mulberry ringspot	MRSV	
Paralongidorus			
<i>P. maximus</i>	Raspberry ringspot	RpRSV	Pfälzer
Xiphinema			
<i>X. americanum</i> (<i>sensu lato</i>)	Cherry rasp leaf	CRLV	
	Peach rosette mosaic	PRMV	
	Tobacco ringspot	TRSV	
	Tomato ringspot	ToRSV	
<i>X. americanum</i> (<i>sensu stricto</i>)	Cherry rasp leaf	CRLV	
	Tobacco ringspot	TRSV	
	Tomato ringspot	ToRSV	
<i>X. bricolensis</i>	Tomato ringspot	ToRSV	
<i>X. californicum</i>	Cherry rasp leaf	CRLV	
	Tobacco ringspot	TRSV	
	Tomato ringspot	ToRSV	
<i>X. diversicaudatum</i>	<i>Arabis</i> mosaic	ArMV	
	Strawberry latent ringspot	SLRSV	
<i>X. index</i>	Grapevine fanleaf	GFLV	
<i>X. intermedium</i>	Tobacco ringspot	TRSV	
	Tomato ringspot	ToRSV	
<i>X. italiae</i>	Grapevine fanleaf	GFLV	
<i>X. rivesi</i>	Cherry rasp leaf	CRLV	
	Peach rosette mosaic	PRMV	
	Tobacco ringspot	TRSV	
	Tomato ringspot	ToRSV	
<i>X. tarjanense</i>	Tobacco ringspot	TRSV	
	Tomato ringspot	ToRSV	

1.2.1 Familie Longidoridae

1.2.1.1 Geschichtlicher Rückblick und Taxonomie

Im Jahre 1874 beschrieb Bütschli unter dem Namen *Dorylaimus maximus* die erste Spezies, die heute zweifelsfrei zur Familie der Longidoridae gehört. 1936 wurde sie von Thorne und Swanger in *Longidorus maximus* umbenannt und schließlich in die von SIDDIQI *et al.* (1963) neu errichtete Gattung *Paralongidorus* eingeordnet (HEYNS, 1975; HUNT, 1993).

1876 beschrieb de Man unter dem Namen *Dorylaimus elongatus* eine Art, die Micoletzky im Jahre 1922 zu der „type species“ der von ihm definierten Untergattung *Longidorus* machte. *Longidorus* wurde 1934 von Filipjev und Thorne unabhängig voneinander zu einer eigenständigen Gattung erklärt, in die Thorne und Swanger nur zwei Jahre später auch die ursprünglich von de Man beschriebene Art einordneten (HOOPER, 1973; HOOPER und SOUTHEY, 1973; TAYLOR und BROWN, 1997).

Die erste beschriebene *Xiphinema*-Art, *X. ensiculiferum*, war 1893 von Cobb zunächst als *Tylencholaimus ensiculiferus* bezeichnet worden. Genau 20 Jahre später errichtete der selbe Autor die Gattung *Xiphinema*, in die er die neu gefundene Spezies *X. americanum* einordnete, nicht jedoch die von ihm zuerst gefundene Art. Diese wurde erst 1937 von Thorne dieser Gattung unterstellt (HUNT, 1993; TAYLOR und BROWN, 1997).

Neben diesen, die virusübertragenden Nematodenarten enthaltenden, Gattungen zählen heute noch drei weitere zur Familie der Longidoridae. Die Gattung *Xiphidorus* wurde 1976 von Monteiro begründet, Khan *et al.* schlugen zwei Jahre später die Errichtung von *Longidoroides* vor (HUNT, 1993; TAYLOR und BROWN, 1997). Die jüngste Gattung ist *Paraxiphidorus*, die erst 1995 von COOMANS und CHAVES vorgestellt wurde.

Die Taxonomie der Longidoridae ist nach wie vor umstritten. Insbesondere bei der *X. americanum*-Gruppe, innerhalb derer es auch einige Virusvektoren gibt, kommt es immer wieder zu Kontroversen, inwieweit einzelne Populationen den Status einer Art verdienen (z.B. BROWN *et al.*, 1993; CHO und ROBBINS, 1991; LAMBERTI und BLEVE-ZACHEO, 1979; LAMBERTI und CIANCIO, 1993; LAMBERTI *et al.*, 2000). Wie bereits COHN und SHER (1972) feststellten, liegt das Problem darin, dass sich viele der zur Differenzierung eingesetzten morphologischen und morphometrischen Charakteristika überschneiden bzw. alle möglichen Zwischenstufen zwischen Extremen zu finden sind. Es ist daher oft nicht einfach zu entscheiden, ob es sich um inner- oder zwischenartliche Variation handelt (z.B. HALBRENDT und BROWN, 1993, 1994) oder, um es in Anlehnung an die Worte von ADAMS (1998) aus-

zudrücken: es ist schwierig zu entscheiden, wie verschieden oder ähnlich Populationen sein müssen, um sie Arten zu nennen.

1.2.1.2 Allgemeine Morphologie

Die zur Familie Longidoridae gehörenden Arten sind sehr lange und schlanke Nematoden, wobei die Spannweite von etwa 1,5 mm bei einigen *Xiphinema*-Spezies bis zu über 12 mm bei manchen *Paralongidorus*-Arten reicht (HUNT, 1993). Typisch ist der ebenfalls sehr lange nadelförmige Mundstachel (Odontostyl), der laut SHURTLEFF und AVERRE (2000) mehr als dreimal so groß ist wie der Körperdurchmesser an der Mundstachelbasis. Das Odontostyl geht über in eine Verdickung (Odontophore), die je nach Gattung unterschiedlich gestaltet sein kann (HUNT, 1993). Bei juvenilen Tieren ist neben dem funktionellen Odontostyl noch ein Ersatzstachel vorhanden, der seinerseits nach der Häutung zum funktionellen Mundstachel wird (HOOPER und SOUTHEY, 1973). Im Bereich des Odontostyls befindet sich ein Führungsring, dessen Lage zur Zuordnung zu Unterfamilien und Gattungen herangezogen wird (SHURTLEFF und AVERRE, 2000).

Weibliche Longidoriden weisen eine in der Regel im Bereich der Körpermitte angesiedelte, spaltförmige Geschlechtsöffnung, die sogenannte Vulva, auf. Bei einigen *Paralongidorus*-Arten befindet sie sich etwas weiter in der hinteren, bei manchen *Xiphinema*-Spezies mehr in der vorderen Körperhälfte (HUNT, 1993).

Die männlichen Geschlechtsorgane, genannt Spicula, sind in der Schwanzregion befindliche, paarig angeordnete, massive und ventral gekrümmte Strukturen (HUNT, 1993).

Bei Männchen und Weibchen ist die Schwanzregion in der Regel ähnlich gestaltet, wobei bei den männlichen Nematoden an Stelle eines Anus (Darmöffnung) eine Kloake vorliegt, da hier neben dem Darm auch der Samenleiter mündet (HOOPER und SOUTHEY, 1973).

1.2.1.3 Lebensweise

Bei den Longidoriden handelt es sich um frei im Boden lebende Nematoden, die die Wurzeln ihrer Wirtspflanzen parasitieren. Durch die vorwiegend an den Wurzelspitzen bzw. kurz dahinter erfolgende Saugtätigkeit werden unter anderem Verdickungen, Gallen, Wurzelstauungen und an den oberirdischen Pflanzenteilen Chlorosen ausgelöst. Bei sehr hohen Populationsdichten kann es auch zu Kümmerwuchs bis hin zum Absterben von Pflanzen kommen.

Als wichtigster indirekter Schaden ist bei manchen Arten die Übertragung von Viren zu nennen (HOOPER und SOUTHEY, 1973; SHURTLEFF und AVERRE, 2000).

Der Lebenszyklus erstreckt sich im allgemeinen über sechs Stadien: Ei, vier Larvenstadien und Erwachsenenstadium. Bei manchen Arten kommen jedoch nur 3 juvenile Formen vor (HALBRENDT und BROWN, 1992, 1993; ROBBINS *et al.*, 1995, 1996). Die Fortpflanzung erfolgt entweder zweigeschlechtlich oder parthenogenetisch. Die Generationsdauer ist meist vergleichsweise lang, weist aber in Abhängigkeit von der Temperatur und der jeweiligen Art erhebliche Schwankungen auf. Erwachsene Longidoriden haben eine Lebensspanne von bis zu mehreren Jahren (HUNT, 1993; SHURTLEFF und AVERRE, 2000). Die aktive Ausbreitung im Boden ist sehr gering und beschränkt sich in der Regel auf deutlich weniger als einen Meter im Jahr (WEISCHER, 1961; THOMAS, 1981; TAYLOR *et al.*, 1994).

In den gemäßigten Klimazonen der Erde erfolgt die Eiablage bei einjährigen Wirtspflanzen einhergehend mit der Bildung neuer Wurzeln im Frühjahr bis Frühsommer. Bei mehrjährigen Pflanzen werden ebenfalls in dieser Zeit die meisten Eier abgelegt, daneben existiert aber ein zweiter Eiablagezeitraum gegen Ende der Wachstumsperiode, der wiederum mit verstärktem Wurzelwachstum korreliert ist. Da zudem verschiedene Lebensstadien zur Überwinterung befähigt sind, findet man für gewöhnlich alle Stadien während des ganzen Jahres (TAYLOR und BROWN, 1997).

Die Gattungen *Longidorus*, *Paralongidorus* und *Xiphinema* kommen in einer Vielzahl unterschiedlicher Bodenarten und -typen vor. Tendenziell scheinen leichtere Böden bevorzugt zu werden, es liegen jedoch je nach Art unterschiedliche Präferenzen vor. Generell ist der Bodenfeuchtigkeit und dem Vorkommen geeigneter Wirtspflanzen eine deutlich größere Bedeutung für das Auftreten dieser Nematoden beizumessen (TAYLOR und BROWN, 1997).

Die vertikale Verteilung im Boden hängt im wesentlichen ab von der Wurzelausbreitung der Wirtspflanze und die größten Populationsdichten sind in der Regel dort zu finden, wo junge, im Wachstum begriffene Wurzeln als Nahrungsquelle zur Verfügung stehen. Daneben scheinen Temperatur und Feuchtigkeit eine Rolle zu spielen (TAYLOR und BROWN, 1997).

In Experimenten konnten einige Longidoridae-Populationen mehrere Jahre ohne Wirtspflanzen im Boden überleben (Literaturstellen bei McNAMARA, 1980).

1.2.2 Virusvektoren im deutschen Weinbau und verwandte Nichtüberträgerarten

Im deutschen Weinbau spielen Nematoden vor allen Dingen als Überträger von Viren aus dem Erregerkomplex der Reisingkrankheit eine Rolle. Die größte Bedeutung kommt hierbei dem Grapevine fanleaf Virus (GFLV) zu, gefolgt von Arabismosaik-Virus (ArMV), Himbeer-ringflecken-Virus (RpRSV), Tomatenschwarzringflecken-Virus (TBRV) und Latentem Erdbeerringflecken-Virus (SLRSV) (RÜDEL, 1985, 1990). Der Kreis der für diese Viren in Frage kommenden Vektoren wird damit auf insgesamt sechs Arten der Longidoridae eingeschränkt, nämlich *L. attenuatus*, *L. elongatus*, *L. macrosoma*, *P. maximus*, *X. diversicaudatum* und *X. index* (Tabelle 1.1). *X. italiae* wurde bislang nicht in Deutschland nachgewiesen (BROWN und TRUDGILL, 1997).

Daneben kommen weitere Angehörige der Familie Longidoridae in Weinbergsböden vor, die teilweise den Überträgerarten sehr ähnlich sehen, von diesen aber unterschieden werden müssen.

1.2.2.1 *Longidorus attenuatus*

Die Art *L. attenuatus* wurde erstmals beschrieben in Großbritannien von HOOPER (1961) und später von BROWN und BOAG (1977). Bereits im Jahr der Erstbeschreibung brachten HARRISON *et al.* (1961) die Art mit Virusübertragung in Verbindung. Inzwischen ist bekannt, dass *L. attenuatus* den englischen und deutschen, nicht aber den schottischen Stamm von TBRV übertragen kann (HARRISON, 1964; FORGHANI *et al.*, 1965). Eine Übertragung des Virus auf Reben wurde erstmals von RÜDEL (1977) beschrieben.

BROWN *et al.* (1989) fanden in Laborexperimenten, dass eine englische Population von *L. attenuatus* englische Isolate von TBRV häufiger übertrug als Isolate aus Deutschland und schlossen daraus auf einen hohen Grad an Spezifität zwischen Virus und Vektor.

Bei *L. attenuatus* handelt es sich um einen etwa 5,2–7,5 mm langen ektoparasitischen Wurzelnematoden, wie Messwerte von 32 Weibchen aus Deutschland und England zeigten. Männchen sind selten, die Fortpflanzung erfolgt parthenogenetisch und es liegen vier Larvenstadien vor. Die Entwicklung vom Ei bis zum adulten Tier dauert unter Feldbedingungen möglicherweise ein bis mehrere Jahre (BROWN und BOAG, 1977).

L. attenuatus kommt besonders in lockeren, sandigen, wasserdurchlässigen Böden vor (HOOPER, 1961; HARRISON, 1964), wobei die Populationsdichte von der Wirtspflanze, die verti-

kale Verteilung zusätzlich dazu auch von der Jahreszeit abhängt (GREEN, 1967; WHITEHEAD *et al.*, 1971; zitiert bei BROWN und BOAG, 1977).

Die Nahrungsaufnahme erfolgt bevorzugt an Wurzelspitzen, was zur Bildung von Gallen und neuen Seitenwurzeln führen kann, wodurch dieser Art insbesondere bei Zuckerrüben auch als Direktschädiger eine Bedeutung zukommt (WHITEHEAD und HOOPER, 1970; WHITEHEAD *et al.*, 1971; zitiert bei BROWN und BOAG, 1977).

L. attenuatus ist polyphag, wobei hauptsächlich krautige Pflanzen befallen werden. Zu den Wirtspflanzen zählen Erdbeere, Gerste, Karotten, Kartoffeln, Klee, Kohl, Kürbis, Luzerne, Reben, Weidelgras, Weizen und Zuckerrübe (entnommen aus BROWN und BOAG, 1977).

1.2.2.2 Longidorus elongatus

Der Nematode *L. elongatus* wurde erstmals im Jahre 1876 in den Niederlanden von de Man unter dem Namen *Dorylaimus elongatus* beschrieben und nach mehreren Umbenennungen und Neubeschreibungen unter anderen Namen im Rahmen der Reihe „C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes“ von HOOPER (1973).

L. elongatus ist als Vektor der schottischen Stämme von TBRV (HARRISON *et al.*, 1961) und RpRSV (TAYLOR, 1962) bekannt.

Es handelt sich um einen Ektoparasiten von etwa 4,5–6,4 mm Länge (HOOPER, 1961, 1973). Männchen sind gewöhnlich selten (HOOPER, 1961; YASSIN, 1969), in einigen Populationen kommen sie jedoch häufig vor (HOOPER, 1973). Deshalb ist in letztgenannten Populationen eine zweigeschlechtliche Vermehrung möglich, normalerweise erfolgt sie jedoch parthenogenetisch. Wie bei *L. attenuatus* liegen auch hier vier Larvenstadien vor, die Entwicklung vom Ei bis zum erwachsenen Tier hängt von der Temperatur ab und erstreckt sich über einen Zeitraum von 9 Wochen (WYSS, 1970) bis hin zu 4-6 Monaten (YASSIN, 1969). Der Zeitpunkt der Eiablage scheint eine Korrelation mit der Bildung neuer Wurzeln aufzuweisen (TAYLOR, 1967; THOMAS, 1969).

L. elongatus kommt in verschiedenen Bodentypen vor (HOOPER, 1973), vorwiegend jedoch auf sandigen bis mittleren Lehmböden (HARRISON, 1964; THOMAS, 1969; WYSS, 1970). Die vertikale Verteilung im Boden ist abhängig von der Wirtspflanze, wobei TAYLOR (1967) bei verschiedenen Wirten die höchsten Populationsdichten in den oberen 20 cm Boden und nur wenige unterhalb von etwa 30 cm vorfand, ähnlich wie BOAG *et al.* (1987), die *L. elongatus* hauptsächlich in den oberen 10 cm Boden beobachteten.

Der Nematode saugt bevorzugt an Wurzelspitzen bzw. in der direkt daran angrenzenden Region, wodurch Verdickungen, Gallen und eine Stauchung des Wurzelsystems ausgelöst werden können; bei Erdbeere, Zuckerrübe, Weidelgras, Karotten und Pfefferminze können dadurch schwere Direktschäden verursacht werden. Auch *L. elongatus* ist polyphag und saugt vorwiegend an krautigen Pflanzen. Insgesamt sind mehr als 60 Wirtspflanzenarten bekannt (HOOPER, 1973). Dieser Umstand zusammen mit der Fähigkeit, längere Hungerperioden zu überstehen (YASSIN, 1969), ermöglicht *L. elongatus* ein Überleben unter verschiedensten Bodenbewirtschaftungssystemen (TAYLOR, 1967).

1.2.2.3 Longidorus macrosoma

L. macrosoma wurde erstmals beschrieben von HOOPER (1961) und später von BROWN und BOAG (1975).

Der Nematode ist als Vektor des englischen Stammes von RpRSV bekannt (HARRISON, 1964), wobei die Übertragungsfähigkeit eine Abhängigkeit von der Temperatur zu haben scheint (DEBROT, 1964) und generell nicht sehr hoch ist (TRUDGILL und BROWN, 1978).

L. macrosoma ist ein etwa 6,8–12,0 mm großer ektoparasitisch lebender Wurzelnematode. Männchen sind häufig, die Fortpflanzung erfolgt zweigeschlechtlich. Die Entwicklungsdauer vom Ei bis zum adulten Tier beträgt etwa zwei Jahre und erstreckt sich über vier Larvenstadien (BROWN und BOAG, 1975). Laut COTTEN (1976) dauert die Entwicklung unter Feldbedingungen mehr als ein Jahr, im Gewächshaus wurde an Himbeere mindestens ein Jahr zur Vollendung des Lebenszyklus benötigt.

Der Nematode kommt besonders in lehmigen, mittleren bis schweren Böden vor (HOOPER, 1961; HARRISON, 1964). Die vertikale Verteilung wird entscheidend durch die Ausbreitung der Wirtspflanzenwurzeln beeinflusst und reicht z.B. bei Himbeere bis zu mindestens 60 cm Tiefe (COTTEN, 1976), bei Weißdorn fand FLEGG (1968a) die meisten Individuen bei etwa 70 cm. *L. macrosoma* saugt bevorzugt an den Wurzelspitzen und löst dadurch Verdickungen und Wurzelspitzengallen aus (BROWN und BOAG, 1975). Es sind eine Vielzahl von Wirtspflanzen bekannt, wobei bei hohen Populationsdichten auch Direktschäden bis hin zum Absterben von Pflanzen auftreten können (WINFIELD, 1974). Einige gute Wirte sind z.B. Himbeere, Kirsche und Schwarze Johannisbeere (COTTEN, 1976).

1.2.2.4 Paralongidorus maximus

Paralongidorus maximus wurde erstmals 1874 von Bütschli in Deutschland unter dem Namen *Dorylaimus maximus* beschrieben. Nach mehreren Umbenennungen wurde die Art schließlich 1964 von Siddiqi der Gattung *Paralongidorus* zugeordnet. 1975 erfolgte eine aktualisierte Beschreibung durch HEYNS.

Die Vektoreigenschaft von *P. maximus* wurde erst 1994 von JONES *et al.* erkannt, nachdem in ihren Experimenten eine Übertragung des Pfälzer-Stammes von RpRSV auf Reben nachgewiesen werden konnte.

Bei der Art handelt es sich ebenfalls um einen ektoparasitisch lebenden Wurzelnematoden von etwa 7–12 mm Länge. Männchen sind ausgesprochen selten und scheinen für die Fortpflanzung keine Rolle zu spielen (HEYNS, 1975). Die Entwicklung vom Ei bis zum erwachsenen Tier erstreckt sich über vier Larvenstadien und einen Zeitraum von mehr als einem Jahr (BOAG *et al.*, 1977).

P. maximus bevorzugt leichte, warme, humose Böden und kommt laut STURHAN (1964) hauptsächlich zwischen 20 und 40 cm Tiefe vor. In einer schottischen Forstbaumschule wurden die größten Populationsdichten jedoch in den oberen 20 cm gefunden, wobei eine Korrelation mit der Verteilung der Wirtspflanzenwurzeln im Boden vermutet wurde (BOAG *et al.*, 1977). Die Art ist polyphag und nutzt neben einer Vielzahl an krautigen Pflanzen auch Gehölze als Wirtspflanzen (STURHAN, 1964; HEYNS, 1975). Besonders in Forstbaumschulen ist *P. maximus* als Direktschädiger gefürchtet (BOAG *et al.*, 1977; McELROY *et al.*, 1977), aber auch junge Rebpflanzen können schwer geschädigt werden (STURHAN, 1964). Die durch die Saugtätigkeit ausgelösten Schäden erstrecken sich über Wurzelverdickungen und -stauchungen, Gallenbildung, Zwerg- und Kümmerwuchs bis hin zum Absterben von Pflanzen (STURHAN, 1964; HEYNS, 1975; BOAG *et al.*, 1977).

1.2.2.5 Xiphinema diversicaudatum

Dieser Nematode wurde erstmals beschrieben von Micoletzky im Jahre 1927 unter dem Namen *Dorylaimus (Longidorus) diversicaudatus* und erhielt 1939 von Thorne seine heutige Bezeichnung. 1974 erfolgte eine aktualisierte Artbeschreibung durch PITCHER *et al.*

X. diversicaudatum ist als Vektor von ArMV (JHA und POSNETTE, 1959; HARRISON und CADMAN, 1959) und von SLRSV (LISTER, 1964) bekannt. Beide Viren können auch auf Reben übertragen werden bzw. sind bereits in Rebpflanzen nachgewiesen worden (VUITTE-

NEZ *et al.*, 1970; RÜDEL, 1978). Die Nematoden bleiben unter Hungerbedingungen rund 24-32 Tage infektiös (HARRISON und WINSLOW, 1961; HARRISON, 1967), laut TAYLOR und THOMAS (1968) kann sich die Retentionszeit bei ArMV über 112 Tage und bei SLRSV über 84 Tage erstrecken.

X. diversicaudatum ist etwa zwischen 4 und 6 mm lang, wobei die morphometrischen Daten zum Teil erheblich schwanken (BROWN und TOPHAM, 1985). Als Ursachen kommen neben unterschiedlichen Verfahren bei der Präparation und Messfehlern auch Biotopunterschiede in Frage (BROWN, 1985a). Männchen sind genauso häufig wie Weibchen, die Fortpflanzung erfolgt zweigeschlechtlich. Es liegen vier Larvenstadien vor und die Entwicklung vom Ei bis zum adulten Tier kann sich unter Feldbedingungen über zwei Jahre erstrecken, wobei Adulte wiederum eine Lebensspanne von 3-5 Jahren haben können (FLEGG, 1968b). BROWN und COIRO (1983) und COIRO *et al.* (1999) berichten von rund 12 Wochen, die zur Vollendung des Lebenszyklus unter Laborbedingungen benötigt werden. Es besteht eine Abhängigkeit nicht nur von der Temperatur, sondern auch von der Wirtspflanze (GRIFFITHS und TRUDGILL, 1983).

X. diversicaudatum kommt im südlichen Großbritannien hauptsächlich auf schwereren Böden vor (HARRISON und WINSLOW, 1961; FLEGG, 1968a). Die vertikale Verteilung ist abhängig von der Wurzel ausdehnung der Wirtspflanze. Laut HARRISON und WINSLOW (1961) kommen die meisten Individuen in der oberen Bodenschicht bis etwa 20 cm vor, einige wenige konnten auch in einer Tiefe bis zu rund 90 cm gefunden werden. Nach BOAG *et al.* (1987) finden sich die meisten Nematoden zwischen etwa 10 und 40 cm.

X. diversicaudatum ist polyphag und saugt sowohl an Wurzeln von Gehölzen als auch von krautigen Pflanzen (HARRISON und WINSLOW, 1961; THOMAS, 1970). Zu den bevorzugten Wirten gehören unter anderen Erdbeere, Himbeere, Hopfen, Rebe und Rose.

Besaugt werden Wurzelspitzen und angrenzende Regionen (TRUDGILL *et al.*, 1991), wobei besonders an Rosen schwerwiegende Gallenbildung beobachtet werden kann.

1.2.2.6 *Xiphinema index*

Diese Art wurde erstmals im Jahre 1950 von Thorne und Allen beschrieben und später von SIDDIQI (1974).

Xiphinema index ist der erste pflanzenparasitäre Nematode, bei dem die Fähigkeit zur Virusübertragung festgestellt wurde: 1958 brachten HEWITT *et al.* ihn mit dem Grapevine Fanleaf Virus in Verbindung. Für die Aquisition des Virus reichen laut DAS und RASKI (1968) we-

nige Minuten und ALFARO und GOHEEN (1974) gehen davon aus, dass Viren sofort mit Beginn der Saugtätigkeit aufgenommen und spezifisch angelagert werden können. Wie bei den übrigen Nematodenarten und den von ihnen übertragenen Viren auch, wird das Grapevine Fanleaf Virus nicht über Eier weitergegeben und Larven verlieren die Fähigkeit zur Virusübertragung mit der Häutung (TAYLOR und RASKI, 1964). Erwachsene *X. index* können ihre Übertragungsfähigkeit bis zu zwölf Wochen bewahren (DAS und RASKI, 1968), unter Hungerbedingungen sogar bis zu acht Monaten (TAYLOR und RASKI, 1964).

Der rund 3 mm große Nematode lebt ektoparasitisch an Wurzeln. Männchen sind ausgesprochen selten, die Vermehrung erfolgt parthenogenetisch. Eine geschlechtliche Fortpflanzung scheint jedoch grundsätzlich möglich zu sein (LUC und COHN, 1982).

Die Entwicklung vom Ei bis zum erwachsenen Tier umfasst vier Larvenstadien und die Dauer ist abhängig von der Temperatur und der Wirtspflanze (COIRO und BROWN, 1984; COIRO *et al.*, 1990a; COIRO *et al.*, 1990b; COIRO *et al.*, 1991; COIRO und AGOSTINELLI, 1991). Die Angaben reichen von gut 3 Wochen (RADEWALD und RASKI, 1962a) bis zu 9 Monaten (COHN und MORDECHAI, 1969) unter Gewächshausbedingungen.

Leichte, sandige Böden werden bevorzugt (SULTAN und FERRIS, 1991), aber auch in schwereren kommt *X. index* gut zurecht. In sehr nassen und sehr trockenen Böden scheint die Überlebensfähigkeit jedoch stark eingeschränkt zu sein (SULTAN und FERRIS, 1991).

FEIL *et al.* (1997) beobachteten bei ihren Untersuchungen in kalifornischen Weinbergen, dass die Populationsdichte in den Reihen höher ist als dazwischen und dass eine Abhängigkeit der Nematodenzahlen sowohl von jahreszeitliche Schwankungen als auch von Bodenfeuchte und -temperatur besteht. Was die vertikale Verteilung im Boden angeht, so fanden RASKI *et al.* (1965) in Kalifornien an Weinreben einzelne Tiere bis in eine Tiefe von 3,6 m.

Auch *X. index* besitzt eine größere Zahl an Wirtspflanzen, wobei jedoch neben der wichtigsten Art Rebe nur die Feige als guter Wirt gilt (COIRO und BROWN, 1984; BROWN und COIRO, 1985; COIRO *et al.*, 1990a; COIRO *et al.*, 1990b; COIRO *et al.*, 1991).

Durch die Saugtätigkeit werden Nekrosen und terminale Wurzelverdickungen ausgelöst, die Bildung von Seitenwurzeln unterbleibt (RADEWALD und RASKI, 1962b). Besaugt werden neben den Spitzen (RADEWALD und RASKI, 1962b) auch andere Wurzelregionen (COHN, 1970).

Laut DI VITO *et al.* (1985) hat die Rebe eine Toleranzschwelle von 1,7 *X. index* pro 10 Kubikzentimeter Boden, bei 2,5 Tieren kommt es bereits zu einer sichtbaren Wuchsreduktion. KIRKPATRICK *et al.* (1965) beobachteten bei hohen Populationsdichten an Reben Blattfall,

verringertes Wachstum, weniger Gescheine, verzögerte Reife bzw. Austrieb, Verrieseln, kleinere Blätter und Früchte sowie eine verringerte Wurzelmasse.

In Gewächshausversuchen überlebten erwachsene *X. index* an Feigenpflanzen rund 64 Wochen lang bei 18 °C und legten etwa 150 Eier ab (BROWN und COIRO, 1985). In Zypern beobachtete PHILIS (1994) nach der Rodung von Reben, dass auf brachliegenden Flächen oder bei Brache im Wechsel mit Gerste nach 40-52 Monaten keine *X. index* mehr zu finden waren und empfiehlt deshalb unter den gegebenen klimatischen Bedingungen eine mindestens 4jährige Anbauunterbrechung. RASKI *et al.* (1965) stellten fest, dass der Nematode in Kalifornien rund 4,5 Jahre bei Wintersaat und Sommerbrache überlebte, was sie auf das Vorhandensein von Rebwurzelresten im Boden zurückführten. Die Autoren schlagen eine mindestens fünfjährige Brache zur Kontrolle von *X. index* bzw. des von ihm übertragenen Grapevine Fanleaf Virus vor.

1.2.2.7 Weitere Longidoriden in Weinbergböden

Neben den Virusüberträgern kommen in deutschen Weinbergböden rund 15 weitere Longidoridae-Arten vor, die bislang nicht als Vektoren angesehen werden (STURHAN, 2003, persönliche Mitteilung). Einige dieser Arten weisen eine große morphologische Ähnlichkeit mit den Überträgerspezies auf. Die morphometrischen Daten für *Xiphinema vuittenezi* (erstmalig beschrieben 1964 von LUC *et al.*) beispielsweise stimmen weitestgehend mit denen von *X. index* überein. Zur Identifikation werden in der Regel Schwanzform und Lage der Geschlechtsöffnung (Vulva) bei Weibchen herangezogen, bei Larven ist eine sichere Zuordnung zu einer der beiden Arten nicht möglich. Zudem herrscht eine gewisse Variabilität bei der Schwanzausprägung und sowohl bei *X. index* als auch bei *X. vuittenezi* findet man Einzeltiere ohne Schwanzspitze (Mucro) (LUC *et al.*, 1964; TZORTZAKAKIS und BROWN, 1996; BARSÌ und LAMBERTI, 2000). *X. vuittenezi* ist diejenige *Xiphinema*-Art, die am häufigsten in deutschen Weinbergs- und Rebschulböden vorkommt (RÜDEL, 1971, 1985; BROWN und TAYLOR, 1987; BLEYER und RÜDEL, 1996) und auch wenn eine Virusübertragung bislang nicht nachgewiesen werden konnte, wurde die Art schon als Vektor des Grapevine Fanleaf Virus in Betracht gezogen (RÜDEL, 1980).

Bei den *Longidorus*-Spezies ist *L. profundorum* Hooper, 1966 einer der weitverbreitetsten Vertreter (BLEYER und RÜDEL, 1996) und weist eine gewisse Ähnlichkeit mit *L. macrosoma* auf, wobei eine sichere Identifikation jedoch nur bei Larven Probleme bereitet. Die adulten Tiere unterscheiden sich deutlich anhand mehrerer Messwerte, insbesondere Körper-

länge, Länge des Mundstachels (Odontostyl), Lippenbreite und Verhältnis von Schwanzlänge zu Schwanzbreite (c'). FRITZSCHE und KEGLER (1968) brachten *L. profundorum* mit dem Himbeerringflecken-Virus in Verbindung, ein eindeutiger Nachweis der Vektoreigenschaft wie von TRUDGILL *et al.* (1983) gefordert, wurde jedoch bislang nicht erbracht.

Deutlich schwieriger als im Fall von *L. profundorum* gestaltet sich die Differenzierung zwischen der erst kürzlich beschriebenen Art *L. helveticus* (LAMBERTI *et al.*, 2001) und *L. macrosoma*, da es bei fast allen morphometrischen Daten Überschneidungen zwischen den beiden Spezies gibt, genauso wie zwischen der ebenfalls erst kürzlich beschriebenen Art *L. sturhani* (RUBTSOVA *et al.*, 2001) und *L. elongatus*. Beide neuen Arten gelten bislang nicht als Virusvektoren, allerdings scheinen zum jetzigen Zeitpunkt außer den von RUBTSOVA *et al.* (2001) erwähnten Tests mit *L. sturhani* und dem Himbeerringflecken-Virus keine diesbezüglichen Untersuchungen durchgeführt worden zu sein.

1.3 Nepoviren

Derzeit werden mehr als 30 Viren zur Gattung *Nepovirus* gerechnet. Es handelt sich hierbei um isometrische Partikel von etwa 28 bis 30 nm Durchmesser, die jeweils einen Teil des zweiteiligen Genomes bestehend aus zwei unterschiedlichen RNA-Strängen enthalten. Die beiden RNA-Typen enthalten verschiedene Informationen und werden gemeinsam für eine erfolgreiche Infektion benötigt. Die meisten Nepoviren haben einen sehr ausgedehnten Wirtspflanzenkreis, der sowohl wildwachsende als auch kultivierte Pflanzen einschließt. Sie können in der Regel durch Samen und Pollen übertragen werden (LISTER und MURANT, 1967) und auch mechanisch durch Presssaft auf krautige Testpflanzen. Die Reaktionen der Pflanzen auf natürliche Infektionen sind sehr vielfältig und reichen von Symptomfreiheit über Verfärbungen, Verformungen und Stauchungen bis hin zum Absterben. Es besteht hierbei nicht nur eine Abhängigkeit von dem Virus bzw. dem Virusstamm, sondern auch von der Wirtspflanze, ihrem Alter und der Jahreszeit (TAYLOR und BROWN, 1997).

1.3.1 Virusübertragung

Longidoriden stechen mit ihrem langen Mundstachel Wurzelzellen an und injizieren ihren enzymhaltigen Speichel durch das kanülenartige Odontostyl. Im Anschluss daran wird der verflüssigte Zellinhalt von dem Nematoden aufgenommen. Dabei können in der Zelle befindliche Viruspartikel einerseits in den Darmtrakt des Nematoden gelangen und einige wenige sich im Bereich des Mundstachels und der Speiseröhre festsetzen. Es muss eine spezifische Erkennungsreaktion zwischen Proteinhülle des Virus und Anlagerungsstelle im Nematoden stattfinden. Bei der Speichelinjektion in neue Pflanzenzellen können einige der Viruspartikel von ihren Anlagerungsstellen gelöst und wieder abgegeben werden. Die genauen Mechanismen, die bei der Anlagerung bzw. Lösung der Viruspartikel eine Rolle spielen, sind bislang nicht bekannt. Vermutet wird, dass Oberflächenladungen involviert sind (BROWN und TRUDGILL, 1997; TAYLOR und BROWN, 1997; SHURTLEFF und AVERRE, 2000).

Die Spezifität zwischen Virus und Vektor äußert sich zum einen in der Fähigkeit, Viren anzulagern und zum anderen, sie auch wieder abzugeben. Nur wenn beide Bedingungen erfüllt sind, kann eine erfolgreiche Übertragung stattfinden (TRUDGILL und BROWN, 1978; TRUDGILL *et al.*, 1981). Das ist manchmal nur bei bestimmten Virusisolaten in Kombination mit bestimmten Vektorpopulationen gegeben (BROWN und TRUDGILL, 1983; BROWN, 1985b, 1986; BROWN *et al.*, 1989).

Die Fähigkeit zur Virusübertragung geht jeweils mit der Häutung verloren (TAYLOR und RASKI, 1964), da die Anlagerungsstellen mitsamt der anhaftenden Partikel hierbei abgestoßen werden.

1.3.2 Symptome der Reisingkrankheit bei Reben

Die Reisingkrankheit ist die im deutschen Weinbau bedeutendste Virose und verursacht zum Teil erhebliche wirtschaftliche Schäden. Fünf verschiedene Nepoviren konnten bislang in reisingkranken Reben nachgewiesen werden, teilweise kommen Mischinfektionen vor (MARTELLI, 1978). Neben dem beteiligten Virus spielen die Rebsorte, die seit der Infektion vergangene Zeit und der Witterungsverlauf eine Rolle für die Stärke der Symptomausprägung. Eine Verbreitung der Krankheit im Weinberg durch Nematoden zeigt sich an dem Auftreten eines sogenannten Befallherdes (Abbildung 1.2).



Abb. 1.2: Reisigkrankheit bei Traminer, Befallsherd

Befallene Stöcke neigen zu schwächerem Wachstum bis hin zu Kümmerwuchs und zur Bildung besenförmiger Triebe. Häufig finden sich Kurzinternodien bzw. Doppelknoten und die Blätter sind untypisch ausgebildet (schwächere oder verstärkte Lappung, Verformungen, usw.) bzw. weisen Verfärbungen (gelbliche bis chlorotische und nekrotische) auf. Bei den Beeren kann es zum Verrieseln mit zum Teil erheblichen Ertragsausfällen bzw. zur Jungfernfrüchtigkeit kommen (Abbildung 1.3) (MARTELLI, 1978; RASKI *et al.*, 1983).



Abb. 1.3: Reisigkrankheit bei Heroldrebe. Links gesunde Traube, rechts Ertragsverluste durch Verrieseln.

Neben Bemühungen zur Eindämmung der Überträgerpopulationen durch Maßnahmen wie beispielsweise Brache (RASKI *et al.*, 1965; PHILIS, 1994) oder der Suche nach Feindpflanzen (DECHET, 1991; SCHAAF, 1999) oder natürlichen Gegenspielern (KERRY und GOWEN, 1995) wird auch über Tests zur Anfälligkeit von *Vitis*-Arten und Resistenzzüchtung versucht, die Reben vor Infektionen bzw. den Auswirkungen der Krankheit zu schützen (BOUQUET, 1981; WALKER *et al.*, 1989; STAUDT und WEISCHER, 1992; BARDONNET *et al.*, 1994).

1.4 Molekularbiologische Diagnosemethoden

1.4.1 Allgemein

Im Bereich der Molekularbiologie sind in den vergangenen Jahren immer neue und bessere Methoden zur Identifikation von Organismen entwickelt worden, die sich auch im Bereich der Nematologie anwenden lassen (JONES *et al.*, 1997). Eine Notwendigkeit zur Anpassung solcher Diagnosemethoden für Nematoden ergibt sich unter anderem auch deshalb, weil die Zahl klassischer Taxonomen ständig abnimmt und es damit nur noch wenige Spezialisten für die Bestimmung anhand morphologischer Merkmale und morphometrischer Daten gibt (BEHANPELLETIER, 1999; ANDRE *et al.*, 2001).

Eine direkte Untersuchung des genetischen Materials stellt nach DE GIORGI *et al.* (1999) eine Methode mit großem Potential für die Nematodenidentifizierung dar, da die DNA unbeeinflusst von Umweltbedingungen, Gewebe und Entwicklungsstadium des Organismus vorliegt. Diese Bedingungen sind beim Vergleich von Genprodukten wie beispielsweise Proteinen oder Isozymen nicht erfüllt (JONES *et al.*, 1997).

Laut JONES *et al.* (1997) kann man grundsätzlich zwischen Techniken unterscheiden, die mehr oder weniger zufällig das gesamte Genom eines Organismus zum Ziel haben und solchen, die spezifisch bestimmte Genombereiche betrachten. Zu den erstgenannten zählen zum Beispiel RAPD (*randomly amplified polymorphic DNA*) und AFLP (*amplified fragment length polymorphism*). Die beiden wohl am häufigsten benutzten spezifischen Regionen für taxonomische und diagnostische Zwecke sind die ribosomale und die mitochondriale DNA (rDNA bzw. mtDNA). Obwohl auch die mitochondriale DNA zahlreiche Vorteile aufweist (JONES *et al.*, 1997), wurden für die vorliegende Arbeit zwei Regionen der rDNA untersucht.

1.4.2 rDNA

Die rDNA enthält die für den Aufbau der Ribosomen benötigte Erbinformation. Sie liegt typischerweise in mehreren aufeinanderfolgenden Kopien im Genom vor und erlaubt damit einen sensitiven Nachweis (JONES *et al.*, 1997). Laut POWERS *et al.* (1997) wird hierdurch die PCR-Amplifikation einzelner Nematoden vereinfacht.

Ribosomale DNA eignet sich nach JONES *et al.* (1997) für diagnostische Zwecke außerdem dadurch, dass neben den konservierten, kodierenden Bereichen auch sehr variable Spacer-Regionen vorhanden sind (Abbildung 1.4). Die Gesamtlänge einer rDNA-Einheit beläuft sich

bei dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* auf rund 7200 Basenpaare (FILES und HIRSH, 1981; ELLIS *et al.*, 1986).

Daneben gilt die rDNA als nützlich für phylogenetische Analysen und Sequenzdaten wurden bereits vielfach zur Konstruktion von Stammbäumen eingesetzt. Für die hier gemachten Untersuchungen war zunächst das 18S-Gen und später die ITS1-Region sequenziert worden.

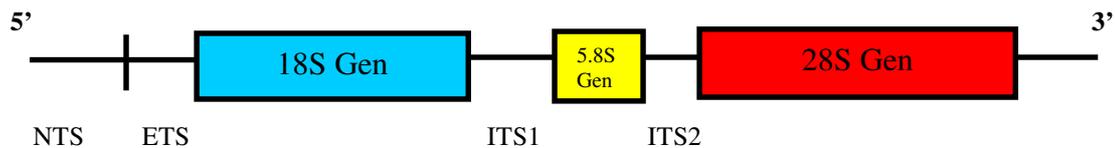


Abb. 1.4: Schematischer Aufbau einer rDNA-Einheit. NTS: non-transcribed spacer, ETS: external transcribed spacer, ITS: internal transcribed spacer

1.4.3 18S-Gen

Das 18S-Gen kodiert für die etwa 1800 Nukleotide (nt) lange 18S rRNA, auch bezeichnet als *small subunit* (SSU) rRNA, da sie Bestandteil der kleineren Untereinheit der Ribosomen von Eukaryoten ist (NOLLER, 1984). Obwohl das 18S-Gen als kodierende Region relativ konserviert ist, wurden Unterschiede zwischen einzelnen Arten aus der gleichen Gattung gefunden (BLAXTER *et al.* 1998; BOUTSIKA, 2002; DE LEY *et al.*, 2002). BLAXTER *et al.* (1998) bezogen in ihre Untersuchungen nur insgesamt zwei Longidoridae-Arten aus unterschiedlichen Gattungen ein, so dass zu Beginn der vorliegenden Arbeit praktisch keine Kenntnisse über die in dieser Familie herrschende Variabilität vorhanden waren.

18S-Sequenzdaten sind in der Nematologie bislang vorwiegend zur Klärung phylogenetischer und taxonomischer Fragestellungen eingesetzt worden (ALESHIN *et al.*, 1998; BLAXTER *et al.*, 1998; DE LEY *et al.*, 1997, 2002; HÜBSCHEN *et al.*, 2002 a, c; KANZAKI und FUTAI, 2002). Daneben wurden Sequenzinformationen aus dieser Region vielfach zur Konstruktion von Primern benutzt, mit deren Hilfe bei verschiedenen Arten die variablen Bereiche der rDNA, wie z.B. ITS, amplifiziert werden können (z.B. VRAIN *et al.*, 1992; FERRIS *et al.*, 1993; GEORGI und ABBOTT, 1998; IWAHORI *et al.*, 1998). Aber auch für Biodiversitätsstudien hat sich das 18S-Gen bereits als nützlich erwiesen (FLOYD *et al.*, 2002; FOUCHER und WILSON, 2002).

1.4.4 ITS1-Region

Die *internal transcribed spacer* 1-Region verbindet das 18S- mit dem 5.8S-Gen (Abbildung 1.4). Während der Transkription wird diese Region mit „abgeschrieben“ und besitzt scheinbar Informationen für die Weiterverarbeitung des rRNA-Transkriptes. Da die ITS-Regionen jedoch keine Geninformationen enthalten, können sich hier auftretende Mutationen wesentlich einfacher etablieren als in den Genen selbst und damit gelten diese Bereiche als relativ variabel. Die auftretende Variation ist jedoch je nach untersuchter Organismengruppe sehr unterschiedlich und reicht bei Nematoden von wenigen Unterschieden zwischen einzelnen Arten (z.B. FERRIS *et al.*, 1995; MITKOWSKI *et al.*, 2002) bis hin zu Unterschieden innerhalb eines einzigen Individuums (z.B. ZIJLSTRA *et al.*, 1995, 1997; CHERRY *et al.*, 1997).

ITS1-Sequenzdaten sind außer zur Klärung von phylogenetischen Fragen (ADAMS, 1998; KANZAKI und FUTAI, 2002; KAPLAN *et al.*, 2000; NGUYEN *et al.*, 2001; POWERS *et al.*, 2001; SABO *et al.*, 2001; SUBBOTIN *et al.*, 2000) bereits vielfach für diagnostische Zwecke im Bereich der Nematologie eingesetzt worden. Besonders häufig wurden variable ITS-Regionen zur Gewinnung von spezifischen Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen (RFLPs) benutzt (BEKAL *et al.*, 1997; CHERRY *et al.*, 1997; FALLAS *et al.*, 1996; FLEMING *et al.*, 1998; HOYER *et al.*, 1998; IBRAHIM *et al.*, 1994; IWAHORI *et al.*, 1998; KNOETZE *et al.*, 2003; NASMITH *et al.*, 1996; NGUYEN *et al.*, 2001; POWERS *et al.*, 1997, 2001; SZALANSKI *et al.*, 1997; THIERY & MUGNIERY, 1996; VRAIN, 1993; VRAIN *et al.*, 1992; WAHEYENBERGE *et al.*, 2000; WENDT *et al.*, 1993; ZIJLSTRA *et al.*, 1995, 1997). Seltener wurden ITS-Sequenzdaten verwendet, um spezifische Primer zu entwickeln (BOUTSIKA, 2002; LIAO *et al.*, 2001; UEHARA *et al.*, 1998; ZIJLSTRA, 1997).

1.5 Evolution

Die Mutation von Genen ist die wohl wichtigste Basis der Evolution. Zu den auftretenden Veränderungen zählen auf der Nukleotidebene Substitutionen (Ersetzung eines Nukleotides durch ein anderes), Insertionen und Deletionen (Einfügung bzw. Wegfall eines oder mehrerer Nukleotide) und Inversionen (umgekehrter Einbau von DNA-Stücken in die Sequenz). Solche Änderungen können durch die genetische Drift und/oder natürliche Auslese (Selektion) innerhalb einer Population verbreitet werden und sich unter Umständen in der Art etablieren (DOVER, 1982). Die Nukleotidsubstitutionen kann man unterteilen in Transitionen (Ersatz einer Purinbase (A oder G) durch die jeweils andere Purinbase bzw. Ersatz einer Pyrimidinbase (C

oder T) durch die jeweils andere Pyrimidinbase) und in Transversionen (Ersatz einer Purin- durch eine Pyrimidinbase oder umgekehrt). Laut KOCHER und WILSON (1991) sind Transitionen häufiger.

Bei repetitiven DNA-Sequenzen, wie zum Beispiel der rDNA, kommt allem Anschein nach eine gemeinsame Evolution (*concerted evolution*) vor, das heißt die einzelnen Einheiten entwickeln sich nicht unabhängig voneinander, sondern es findet ein Homogenisierungsprozess statt, der dafür sorgt, dass die entsprechenden Sequenzen der Einheiten angeglichen werden (DOVER, 1982, 1989; HILLIS *et al.*, 1991). Diese Anpassung beruht auf den Mechanismen des sogenannten *molecular drive*, bei dem es durch Sequenzaustausch innerhalb und/oder zwischen Chromosomen zu einer Verbreitung einer Mutation innerhalb einer Genfamilie und zu ihrer Fixierung in dem Organismus kommen kann (Dover, 1982, 1989; HILLIS *et al.*, 1991). Die so erreichte Homogenität der repetitiven Einheiten ist größer innerhalb einer Art als zwischen Arten, was einen wichtigen Vorteil für phylogenetische Analysen darstellt.

1.6 Phylogenie

Die Klassifikation von Nematoden beruht traditionell auf morphologischen und anatomischen Charakteristika einzelner Gruppen (ALESHIN *et al.*, 1998; COOMANS *et al.*, 2001). Zusammen mit der Bewertung, ob bestimmte Merkmale in einer primitiven oder weiter entwickelten Form vorliegen, können Aussagen über phylogenetische Beziehungen zwischen den Organismen getroffen werden (COOMANS, 1996; COOMANS *et al.*, 2001).

Mit der Einführung moderner molekularbiologischer Techniken war es möglich, Phylogenien anhand von Sequenzinformationen zu erstellen (ALESHIN *et al.*, 1998; BLAXTER *et al.*, 1998). Es ist dabei von Vorteil, dass eine Vielzahl von Genen existiert, die gleichermaßen bei allen Arten vorkommen und die sich damit zur Untersuchung von phylogenetischen Verhältnissen besonders eignen.

Hierzu gehören die rRNA-Gene, die zusammen mit ihren Spacer-Regionen in allen Organismen in vielfachen Kopien im Genom vorliegen. Vorteilhaft ist insbesondere, dass die verschiedenen Regionen der rDNA sehr unterschiedliche Evolutionsraten aufweisen, so dass Phylogenien sowohl für weiter entfernte als auch für nahe verwandte Organismen erstellt werden können (DORRIS *et al.*, 1999).

Die phylogenetische Analyse von Sequenzdaten hat zwei Hauptziele, nämlich einerseits den besten Stammbaum ausfindig zu machen und andererseits die Qualität desselben zu beurteilen. Um die erste Forderung zu erfüllen, existieren verschiedene Verfahren, von denen sich

die Maximum Likelihood Analyse dann als überlegen dargestellt hat, wenn die Evolutionsparameter anhand der Daten geschätzt werden sollen (HUELSENBECK, 1995). Zudem erlaubt diese Methode eine Beurteilung der Ergebnisse während verschiedener Stadien der Analyse, ist aber sehr langsam und aufwändig, wenn viele Sequenzen in die Untersuchungen einbezogen werden (WHELAN *et al.*, 2001). Ein häufig benutztes Verfahren zur Beurteilung eines phylogenetischen Stammbaumes ist das sogenannte nichtparametrische Bootstrapping (FELSENSTEIN, 1985), bei dem aus den Ursprungsdaten durch wiederholte Neuanalyse eine Vielzahl (meist 100 oder 1000) an Stammbäumen konstruiert wird. Der Bootstrap-Wert gibt dann an, bei welchem Prozentsatz der Bäume eine bestimmte Gruppierung aufgetreten ist. Bei Werten unter 50% gilt die Topographie als nicht verlässlich (WRIGHT, 2001). Um die Qualität zu erhöhen, gibt es laut WHELAN *et al.* (2001) die Möglichkeit, mehr oder aber längere Sequenzen zu verwenden, wobei letzteres zu einer gleichmäßigen Erhöhung der Informationsdichte über den ganzen Baum gesehen führt.

2. Material und Methoden

2.1 Sequenzierung des 18S-Genes und Analyse der Daten (durchgeführt am Scottish Crop Research Institute (SCRI))

2.1.1 Material

2.1.1.1 Nematoden

Als Ausgangsmaterial wurden zunächst zur Etablierung eines gut funktionierenden Systems einzelne Nematoden der Arten *X. diversicaudatum* und *X. index* aus den am SCRI bestehenden Zuchten verwendet. Nachdem die Bedingungen für DNA-Extraktion und PCR optimiert und zuverlässig arbeitende Primerpaare gefunden worden waren, konnte die eigentliche Versuchsarbeit mit verschiedenen Herkünften der Nematodenarten (Tabelle 2.1) begonnen werden. Hierzu wurden entweder mit Hilfe der am SCRI üblichen Methode Nematoden aus den dortigen Zuchtansätzen frisch extrahiert oder in 1 M NaCl im Gefrierschrank aufbewahrte Individuen verwendet.

Tab. 2.1: Herkünfte unterschiedlicher Populationen der drei Nematodenarten *X. diversicaudatum*, *X. index* und *X. vuittenezi*
GB = Großbritannien, F = Frankreich, D = Deutschland

	Nematodenart	Herkunft
1	<i>X. diversicaudatum</i>	Deutschland (Zucht SCRI)
2	<i>X. diversicaudatum</i>	Hilton (GB)
3	<i>X. diversicaudatum</i>	Irchmartine (GB)
4	<i>X. diversicaudatum</i>	Lialithgow (GB)
5	<i>X. diversicaudatum</i>	Neuseeland
6	<i>X. diversicaudatum</i>	Schottland
7	<i>X. diversicaudatum</i>	Schweiz
8	<i>X. diversicaudatum</i>	Tschechische Republik
9	<i>X. index</i>	Deutschland (Zucht SCRI)
10	<i>X. index</i>	Guebwiller (F)
11	<i>X. index</i>	Iphofen (D)
12	<i>X. index</i>	Israel
13	<i>X. index</i>	Italien
14	<i>X. index</i>	Klotten (D)
15	<i>X. index</i>	Kreta
16	<i>X. index</i>	Neustadt (D)
17	<i>X. index</i>	Sausenheim (D)
18	<i>X. index</i>	Turckheim (F)
19	<i>X. index</i>	Zucht SLFA Neustadt (D)
20	<i>X. vuittenezi</i>	Bulgarien
21	<i>X. vuittenezi</i>	Deutschland
22	<i>X. vuittenezi</i>	Frankreich
23	<i>X. vuittenezi</i>	Slowakei

Tab. 2.2: Untersuchte Populationen der zu den Gattungen *Longidorus*, *Paralongidorus* und *Xiphinema* gehörenden Nematodenarten

	Nematodenart	Herkunft
1	<i>L. aetnaeus</i>	Bulgarien
2	<i>L. apulus</i>	Zucht (SCRI)
3	<i>L. breviannulatus</i>	Arkansas (USA)
4	<i>L. camelliae</i>	China
5	<i>L. crassus</i>	Arkansas (USA)
6	<i>L. elongatus</i>	Niederlande
7	<i>L. euonymus</i>	Slowakei
8	<i>L. goodeyi</i>	Schottland
9	<i>L. helveticus</i>	Schweiz
10	<i>L. intermedius</i>	Slowakei
11	<i>L. juvenilis</i>	Slowakei
12	<i>L. leptocephalus</i>	Slowakei
13	<i>L. litchii</i>	China
14	<i>L. macrosoma</i>	Deutschland
15	<i>L. nevesi</i>	Slowakei
16	<i>L. piceicola</i>	Slowakei
17	<i>L. pisi</i>	Griechenland
18	<i>L. poessneckensis</i>	Slowakei
19	<i>L. sp.</i>	Arkansas (USA)
20	<i>L. sp.</i>	Arkansas (USA)
21	<i>L. sp.</i>	Arkansas (USA)
22	<i>L. sp.</i>	Arkansas (USA)
23	<i>L. sp.</i>	Arkansas (USA)
24	<i>L. sp.</i>	Arkansas (USA)
25	<i>L. sp.</i>	California (USA)
26	<i>L. sp.</i>	Georgia (USA)
27	<i>L. sp.</i>	Kreta
28	<i>L. sp.</i>	Türkei
29	<i>L. vineacola</i>	Schottland
30	<i>P. maximus</i>	Deutschland
31	<i>P. rex</i>	Ukraine
32	<i>X. americanum sp.</i>	China
33	<i>X. americanum sp.</i>	China
34	<i>X. americanum sp.</i>	China
35	<i>X. americanum sp.</i>	China
36	<i>X. bakeri</i>	Arkansas (USA)
37	<i>X. citricolum</i>	USA
38	<i>X. dentatum</i>	Slowakei
39	<i>X. floridae</i>	USA
40	<i>X. georgianum</i>	USA
41	<i>X. italiae</i>	Kreta
42	<i>X. italiae</i>	Kreta
43	<i>X. italiae</i>	Slowakei
44	<i>X. pachtaicum</i>	Slowakei
45	<i>X. radiculicola</i>	USA
46	<i>X. rivesi</i>	Arkansas (USA)
47	<i>X. rivesi</i>	Arkansas (USA)
48	<i>X. simile</i>	ehem. Jugoslawien
49	<i>X. sp.</i>	Arkansas (USA)
50	<i>X. sp.</i>	Bulgarien
51	<i>X. sp.</i>	Bulgarien
52	<i>X. sp.</i>	Bulgarien
53	<i>X. sp.</i>	Nigeria
54	<i>X. sp.</i>	Portugal
55	<i>X. sp.</i>	Portugal
56	<i>X. tarjanense</i>	Arkansas (USA)
57	<i>X. taylora</i>	Slowakei
58	<i>X. turcicum</i>	Bulgarien

Zusätzlich dazu wurden weitere Nematodenarten der Familie Longidoridae aus den Gattungen *Xiphinema*, *Longidorus* und *Paralongidorus* in die Untersuchungen einbezogen (Tabelle 2.2). Zum Vergleich wurde die 18S-Genregion der beiden nicht zur selben Familie gehörenden Nematodenarten *Mononchus aquaticus* (Mononchidae) und *Belonolaimus longicaudatus* (Belonolaimidae) sequenziert.

Zur Absicherung der Ergebnisse wurden in der Regel mindestens zwei Einzeltiere pro Population verwendet.

2.1.1.2 Primer

Um eine Sequenzierung des 18S-Genes durchführen zu können, muss die entsprechende Region zuerst mit Hilfe geeigneter Primer in einer PCR amplifiziert werden, um genügend DNA-Ausgangsmaterial zur Verfügung zu stellen.

Getestet wurden zu diesem Zwecke insgesamt 19 Primer in unterschiedlichen Kombinationen, die entweder zuvor schon zur Sequenzierung anderer Nematodenarten am SCRI oder an der Universität in Edinburgh eingesetzt worden waren. Die für die weiteren Versuche ausgewählten 8 Primer sind in Tabelle 2.3 aufgelistet und ihre ungefähren Anlagerungsstellen im 18S-Gen in Abbildung 2.1 dargestellt.

Tab. 2.3: Zur Sequenzierung des 18S-Genes verwendete Primer, deren Länge, Sequenzen und Amplifikationsrichtungen
A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin, K = G oder T, W = A oder T, Y = C oder T

Primer	Länge	Sequenzen in 5´-3´-Richtung	Amplifikationsrichtung
G18S4	21 bp	GCT TGT CTC AAA GAT TAA GCC	vorwärts
A (=RN18A)	19 bp	AAA GAT TAA GCC ATG CAT G	vorwärts
9R	20 bp	AGC TGG AAT TAC CGC GGC TG	rückwärts
22F	19 bp	TCC AAG GAA GGC AGC AGG C	vorwärts
13R	19 bp	GGG CAT CAC AGA CCT GTT A	rückwärts
2FX	22 bp	GGA AGG GCA CCA CCA GGA GTG G	vorwärts
23F	19 bp	ATT CCG ATA ACG AGC GAG A	vorwärts
18P	20 bp	TGA TCC WKC YGC AGG TTC AC	rückwärts

Quelle: <http://nema.cap.ed.ac.uk/biodiversity/sourhope/nemoprimer.html>

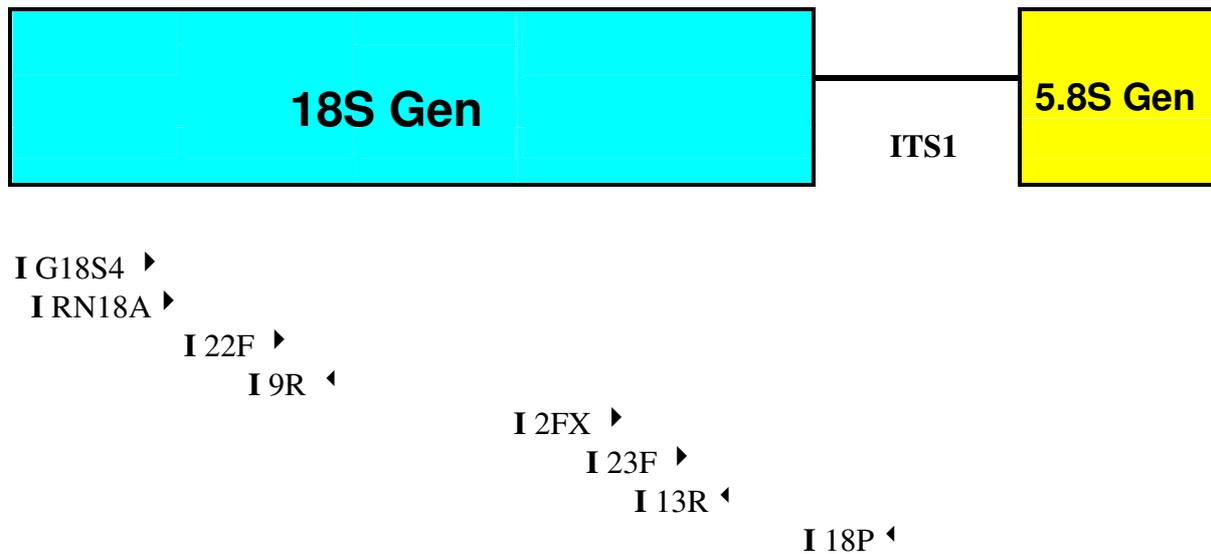


Abb. 2.1: Ungefähre Anlagerungspositionen und Amplifikationsrichtungen der Primer aus Tabelle 2.3 (Quelle: <http://nema.cap.ed.ac.uk/biodiversity/sourhope/nemoprimer.html>)

Bevorzugt verwendet wurden die Kombinationen RN18A/9R, 22F/13R und 2FX/18P, nur in Ausnahmefällen wurden zur Amplifizierung des Anfangs- bzw. Endbereiches des 18S-Genes die Kombinationen G18S4/9R bzw. 23F/18P eingesetzt.

RN18A gilt im Gegensatz zu G18S4 als nematodenspezifischer Primer und 2FX ergibt im Vergleich zu 23F ein größeres Fragment und damit mehr Überlappung mit dem von 22F/13R amplifizierten Bereich.

2.1.2 Methoden

Die Untersuchungen erfolgten in Anlehnung an bereits zuvor erfolgreich am SCRI durchgeführte ähnliche Versuche mit anderen Nematodenarten. Bis auf die Optimierung von Extraktions- und PCR-Bedingungen wurden in der Regel die zusammen mit den verwendeten Kits und Materialien gelieferten Arbeitsanweisungen befolgt.

2.1.2.1 DNA-Extraktion

Die Extraktion der Nematoden-DNA wurde in Anlehnung an die bei STANTON *et al.* (1998) beschriebene Methode e) durchgeführt.

Hierzu wurde ein einzelner Nematode in 20 µl 0,25 M NaOH-Lösung gegeben und das Reaktionsgefäß anschließend ca. 5 Sekunden auf höchster Stufe zentrifugiert, um sicherzustellen, dass der Nematode vollständig von der Lösung umgeben war. Nach einer Inkubation über Nacht im Heizblock bei 25 °C wurde das Reaktionsgefäß am darauffolgenden Tag für drei Minuten in einen 99 °C heißen Heizblock eingestellt, bevor

10 µl 0,25 M HCl,

5 µl 0,50 M Tris-HCl (pH 8) und

5 µl 2 %iges Triton X-100

zugegeben wurden.

Abschließend wurde das Extraktionsgefäß für weitere drei Minuten bei 99 °C inkubiert. Die so gewonnene DNA konnte entweder direkt in einer PCR eingesetzt werden oder wurde bei -20 °C im Gefrierschrank aufbewahrt.

2.1.2.2 PCR

Für die PCR wurden 0,2 ml Eppendorf-Gefäße mit jeweils zwei Ready-To-GoTM PCR Beads (Amersham Pharmacia Biotech) verwendet. In jedes dieser Tubes wurden nacheinander

47,5 µl H₂O_{dest.}

0,5 µl extrahierte Nematoden-DNA und jeweils

1,0 µl der beiden Primer (10 µM)

pipettiert, so dass sich ein Reaktionsvolumen von insgesamt 50 µl ergab. Das für die PCR verwendete Programm war durch Vorversuche mit Variationen von Zyklenzahl und Primeranlagerungstemperatur ermittelt worden und ist in Tabelle 2.4 beschrieben. Für alle Primerpaare konnten dieselben PCR-Bedingungen Verwendung finden.

Tab. 2.4: PCR-Bedingungen

Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
2.45 min	94 °C	1
1.00 min	94 °C	} 40
0.45 min	57 °C	
2.00 min	72 °C	
10.00 min	72 °C	1
unendlich	4 °C	

2.1.2.3 Gelelektrophorese

Es wurde ein 1 %iges Agarose-Gel (0,5 g Agarose auf 50 ml TBE-Puffer, pH 7-8) verwendet, welches vor dem Aushärten mit 1,5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versehen worden war.

Das Gel wurde dann mit TBE-Puffer vollständig überschichtet, bevor 5 µl des jeweiligen PCR-Produktes mit 1 µl Beladungslösung vermischt und aufgetragen wurden.

Zusätzlich fanden 5 µl eines 1 kb DNA-Markers zum Vergleich der Fragmentgröße Verwendung (Abbildung 2.2). Die Elektrophorese wurde in der Regel bei 75 oder 100 Volt ohne Kühlung durchgeführt.

Das Gel wurde mit Hilfe eines UV-Transilluminators ausgewertet und das Ergebnis meist mit einer Digital- oder Polaroidkamera dokumentiert.

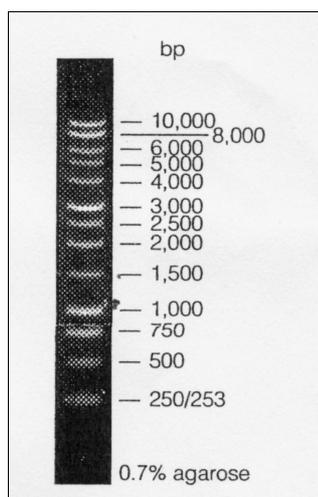


Abb. 2.2: 1 kb DNA-Marker (Promega)

2.1.2.4 Reinigung der PCR-Produkte

Zur Reinigung der PCR-Produkte wurde das PCR Purification Kit der Firma QIAGEN Ltd. verwendet. Die Arbeitsschritte erfolgten gemäß Anleitung des Herstellers bei Verwendung einer Vakuumpumpe.

Zu 225 µl Puffer PB (im Kit vorhanden) wurden die nach der Gelelektrophorese übrigen 45 µl PCR-Produkt hinzugegeben und das Gemisch kurz geschüttelt.

Auf die Ventile der Vakuumpumpe wurden spezielle, ebenfalls im Kit vorhandene Gefäße, die sogenannten QIAquick Säulen, angebracht und in diese die PCR-Produkt/Puffer-Gemische eingefüllt. Die Flüssigkeit wurde nun durch eine in den Säulen befindliche Membran hindurchgesaugt und letztere anschließend mit 750 µl Puffer PE gespült. Danach wurden die Säulen abgenommen, in 2 ml Sammelgefäße gestellt und eine Minute lang bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Sammelgefäße wurden inklusive des darin enthaltenden Rests an Puffer PE verworfen und die Säulen in neue 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt.

Um die von der Membran zurückgehaltene DNA zu eluieren, wurden die Säulen nach Zugabe von 50 µl destilliertem Wasser in die Membranmitte etwa eine Minute stehen gelassen und dann bei Höchstgeschwindigkeit eine Minute zentrifugiert.

Die so gereinigte DNA wurde entweder sofort verwendet oder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Gefrierschrank aufbewahrt.

2.1.2.5 Sequenzierung

Die Sequenzierungs-PCR wurde als Einzelstrang-Sequenzierung mit nur einem Primer pro Reaktionsgefäß durchgeführt. Es fanden 0,2 ml Eppendorf-Gefäße Verwendung, in die nacheinander

4 µl Terminator Ready Reaction Mix (Applied Biosystems),

5 µl gereinigte DNA und

1 µl des jeweiligen Primers ($3,4\text{ }\mu\text{M}$)

(in der Regel einer der beiden Primer, mit denen zuvor die PCR durchgeführt worden war) hineingegeben wurden, so dass sich ein Gesamtreaktionsvolumen von 10 µl ergab. Bei sehr kräftigen Banden in der Gelelektrophorese wurde gegen Ende der Versuchsreihe die Menge

an Reagenzien halbiert, um die Kosten zu reduzieren. Die Reaktionsbedingungen sind Tabelle 2.5 zu entnehmen.

Tab. 2.5: Bedingungen für Sequenzierungs-PCR

Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
10 sec	94 °C	} 25
5 sec	50 °C	
4 min	60 °C	
unendlich	4 °C	

2.1.2.6 Präzipitation der DNA

Die Präzipitation der DNA erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers des Sequenzierungsmixes (Applied Biosystems). Dazu wurden nacheinander

- 1 µl 3 M Natriumacetat, pH 5,5,
- 25 µl 95 %iges Ethanol und
- 10 µl Sequenzierungs-PCR-Produkt

in 0,5 ml Reaktionsgefäße gegeben. Nach kurzem Mischen wurden die Tubes 20 Minuten lang auf höchster Stufe zentrifugiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit möglichst vollständig abpipettiert, das Pellet mit 125 µl 70 %igem Ethanol gespült und die Reaktionsgefäße kurz geschüttelt, bevor sie für weitere 5 Minuten bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 2 Minuten bei 70 °C im Heizblock getrocknet. Die Elektrophorese mit anschließender Auswertung wurde in einem zum SCRI gehörenden Speziallabor mit Hilfe der Sequenziermaschine ABI Prism™ 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems) durchgeführt.

2.1.2.7 Sequenzdatenanalyse

Die vom Sequenzierungslabor zur Verfügung gestellten Rohsequenzen wurden mit Hilfe des Software-Programmes Sequence Navigator (1.0.1) editiert. Hierbei wurde die vom Computer vorgegebene Basenabfolge mit den Sequenzchromatogramm-Peaks verglichen. Die fertig

editierten Sequenzen wurden dann im GCG (Genetics Computer Group)-Format gespeichert und mit Hilfe von Rapid-FTP in das GCG-Programmpaket kopiert.

Innerhalb dieses Paketes wurden die folgenden Anwendungen benutzt: GelStart, GelEnter, GelMerge, GelView und GelAssemble. Mit GelStart wird entweder ein existierendes Projekt zur Aneinanderlagerung von Sequenzfragmenten aufgerufen oder ein neues gestartet. GelEnter liest die gewünschten Fragmente in das Projekt ein und GelMerge führt das Alignment durch. Dabei werden die Sequenzfragmente je nach Ähnlichkeit in sogenannte Contigs eingeordnet, deren Inhalte mit Hilfe von GelView sichtbar gemacht werden können. GelAssemble schließlich ermöglicht es, die Basenabfolgen der einzelnen Fragmente innerhalb eines Contigs einzusehen und zu editieren.

In der Regel wurden pro Nematodenpopulation mindestens zwei Einzeltiere sequenziert und pro Nematode insgesamt sechs Sequenzfragmente erhalten. Die daraus resultierenden zwölf Sequenzen wurden zusammengelagert und versucht, eine gemeinsame Konsensussequenz für jede Population festzulegen.

Die so erhaltenen Daten konnten dann für Vergleiche der einzelnen Nematodenherkünfte hinsichtlich Unterschieden innerhalb einer Art, zwischen Arten einer Gattung und zwischen Gattungen benutzt werden.

2.1.2.8 Phylogenetische Analyse

1. BioEdit (4.8.4), Clustal X (1.81) und GeneDoc (2.6)

Die Konsensussequenzen wurden mittels Notepad-Programm in BioEdit kopiert. Obwohl dieses Programm selbst Möglichkeiten zum Editieren, Verändern und Analysieren von Sequenzen bietet, wurde es in der vorliegenden Arbeit nur benutzt, um die Konsensussequenzen zusammenzukopieren und in einem für die anderen Analyseprogramme geeigneten Format abzuspeichern.

Mit Hilfe von Clustal X wurde die eigentliche Aneinanderlagerung der Konsensussequenzen durchgeführt. Das daraus resultierende Alignment wurde zum Editieren in GeneDoc übertragen, wo geprüft wurde, ob alle Sequenzen richtig aneinandergelagert worden waren und wo Spalten mit nur wenigen bzw. nur einem informativen Charakter von der weiteren Analyse ausgeschlossen wurden. Die Sequenzinformation wurde dann im PHYLIP (PHYLogeny Inference Package)-Format gespeichert.

2. TREE-PUZZLE (5.0), PHYLIP (3.5c)

Die PHYLIP-Datei wurde nun in TREE-PUZZLE geöffnet und Transition/Transversions-Wert und Alpha-Parameter der Gammaverteilung geschätzt.

Die SEQBOOT-Anwendung des PHYLIP-Programmpaketes wurde verwendet, um eine sogenannte „Outweights“-Datei zu erstellen. Diese wird zusammen mit den von TREE-PUZZLE geschätzten Parametern für die “Maximum Likelihood”-Analyse von DNAML (ebenfalls ein PHYLIP-Programm) benötigt. Die Anwendung CONSENSE schließlich produziert einen Konsensusstammbaum aus all den in DNAML konstruierten Stammbäumen, wobei die am häufigsten auftretenden Gruppierungen zugrunde gelegt sind. Gleichzeitig werden die sogenannten Bootstrap-Werte angegeben, die anzeigen, in wieviel Prozent der Stammbäume eine bestimmte Gruppierung aufgetreten ist und die damit einen Maßstab für die Verlässlichkeit der Einordnungen darstellen.

2.2 Sequenzierung der ITS1-Region und Primerkonstruktion

2.2.1. Material

2.2.1.1 Nematoden

Zur Sequenzierung wurden neben Herkünften der Virusüberträger *Longidorus attenuatus*, *L. elongatus*, *L. macrosoma* und *Paralongidorus maximus* auch Einzeltiere weiterer, in deutschen Weinbergböden vorkommender *Longidorus*-Arten verwendet (Tabelle 2.6).

Tab. 2.6: Zur Sequenzierung eingesetzte Nematoden und deren Herkünfte
W = Weibchen, L = Larve, M = Männchen

Nematodenart	Population	Herkunft	Verwendete Tiere
<i>L. attenuatus</i>	Gau Algesheim	Rheinhausen	3 W + 2 L
<i>L. attenuatus</i>	Mettenheim	Rheinhausen	1 W + 1 L
<i>L. elongatus</i>	Bad Dürkheim	Pfalz	2 W
<i>L. elongatus</i>	Heppenheim	Hessische Bergstrasse	1 W
<i>L. elongatus</i>	Niederlande	Zucht SCRI	1 W + 1 M + 1 L
<i>L. macrosoma</i>	Freiburg	Baden	1 M + 1 L
<i>L. macrosoma</i>	Heppenheim	Hessische Bergstrasse	2 W + 1 M
<i>L. macrosoma</i>	Landau	Pfalz	2 L
<i>P. maximus</i>	Kallstadt	Pfalz	1 W + 1 L
<i>P. maximus</i>	Mußbach	Pfalz	2 W + 2 L
<i>L. helveticus</i>	Horrweiler	Nahe	1 M + 1 L
<i>L. helveticus</i>	Roche d'Or	Schweiz	1 W + 2 L
<i>L. profundorum</i>	Gau Algesheim	Rheinhausen	1 M + 1 L
<i>L. profundorum</i>	Horrweiler	Nahe	1 W + 1 L
<i>L. sturhani</i>	Gau Algesheim	Rheinhausen	1 W + 1 L
<i>L. sturhani</i>	Ockenheim	Rheinhausen	1 W + 1 L

2.2.1.2 Primer

Für die Amplifikation und die anschließende Sequenzierung der ITS1-Region wurden die beiden universellen Primer B118 (BOUTSIKA, 2002) und RN58SR (Herkunft unbekannt) eingesetzt (Tabelle 2.7). Ihre Anlagerungspositionen sind in Abbildung 2.3 dargestellt.

Tab. 2.7: Länge, Sequenzen und Amplifikationsrichtungen der zur Sequenzierung der ITS1-Region verwendeten Primer

A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin, M = A oder C

Primer	Länge	Sequenzen in 5'-3'-Richtung	Amplifikationsrichtung
B118	19 bp	CCC GTC GMT ACT ACC GAT T	vorwärts
RN58SR	20 bp	ACG AGC CGA GTG ATC CAC CG	rückwärts

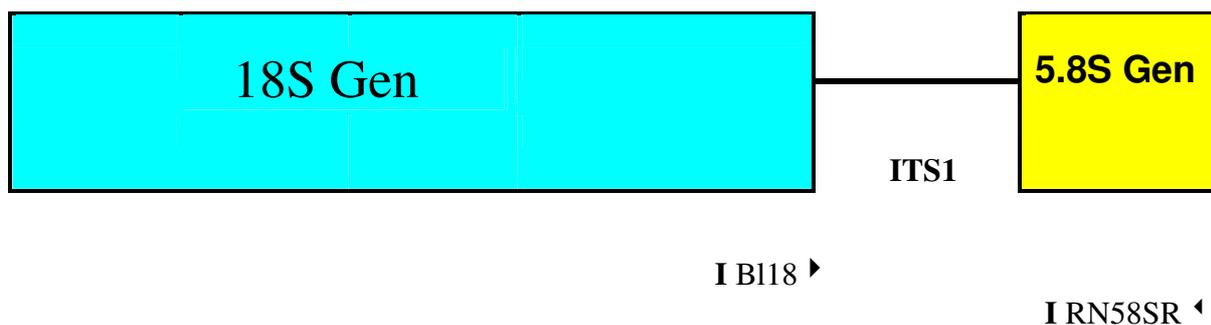


Abb. 2.3: Ungefähre Anlagerungsstellen und Amplifikationsrichtungen der beiden Primer aus Tabelle 2.7

2.2.2 Methoden

2.2.2.1 Extraktion der Nematoden aus Bodenproben bzw. aus den Zuchtansätzen

Für die Sequenzierungsarbeiten sollten möglichst mehrere Populationen der zu untersuchenden *Longidorus*-Arten und von *Paralongidorus maximus* verwendet werden. Hierzu standen einerseits bereits voruntersuchte Bodenproben zur Verfügung, zum anderen wurde Weinbergserde an bekannten Nematoden-Fundstellen entnommen.

Das Auswaschen der Bodenproben lief jeweils in Anlehnung an die bei SCHAAF (1999) beschriebene Extraktionsmethode ab: die Erde wurde in einer Porzellanschale mit Leitungswas-

ser aufgeschwemmt und anschließend der Überstand auf ein Analysesieb mit einer Maschenweite von 200 μm abgossen. Nach weiteren vier Wiederholungen dieses Vorganges wurde die Resterde verworfen und stattdessen der Siebrückstand in die Schale überführt. Dieser wurde dann insgesamt dreimal aufgeschwemmt und der Überstand jeweils in ein 160 μm -Analysesieb abgossen. Der daraus resultierende Siebrückstand wurde auf ein in einer Petrischale liegendes Nylonsieb mit einer Maschenweite von 150 μm abgeschwemmt und zwar so, dass die Schale bis kurz oberhalb des Siebes mit Wasser gefüllt war. Anschließend wurde das Gefäß bei Zimmertemperatur in den dunklen Klimaschrank gestellt und über Nacht dort belassen. Am nächsten Tag wurde das Nylonsieb vorsichtig entfernt und die Probe unter dem Binokular bei 10facher Vergrößerung auf Nematoden untersucht.

2.2.2.2 Nematodenidentifikation

Aus der zum Teil großen Vielfalt an Nematodenarten wurden dem Körperbau nach lange und schlanke Tiere mit Hilfe einer an einem Holzstab befestigten Schweineborste herausgefischt und in einen auf einem Objektträger befindlichen Wassertropfen überführt. Unter dem Mikroskop wurde zunächst bei geringer Vergrößerung auf das Vorhandensein eines Mundstachels geprüft. Um die Zugehörigkeit zu einer der in Abbildung 2.4 dargestellten Longidoridae-Gattungen zu ermitteln, wurde bei höherer Vergrößerung die Ausbildung der Odontophore und die Lage des Führungsrings untersucht (Tabelle 2.8). Die Zuordnung zur Gattung *Paralongidorus* konnte relativ einfach vorgenommen werden, da die einzige bislang in Deutschland gefundene Art *P. maximus* eine durch Einschnürung deutlich abgesetzte Lippenregion aufweist (Tabelle 2.9). Die *Xiphinema*-Arten konnten durch die typische Ausbildung der Odontophorenbasis leicht von Mitgliedern der anderen beiden Gattungen abgegrenzt werden. Die *Longidorus*-Arten wurden meist durch den deutlich sichtbaren, im vorderen Mundstachelbereich befindlichen Führungsring sowie durch die Odontophorenausbildung zugeordnet (Abbildung 2.4).

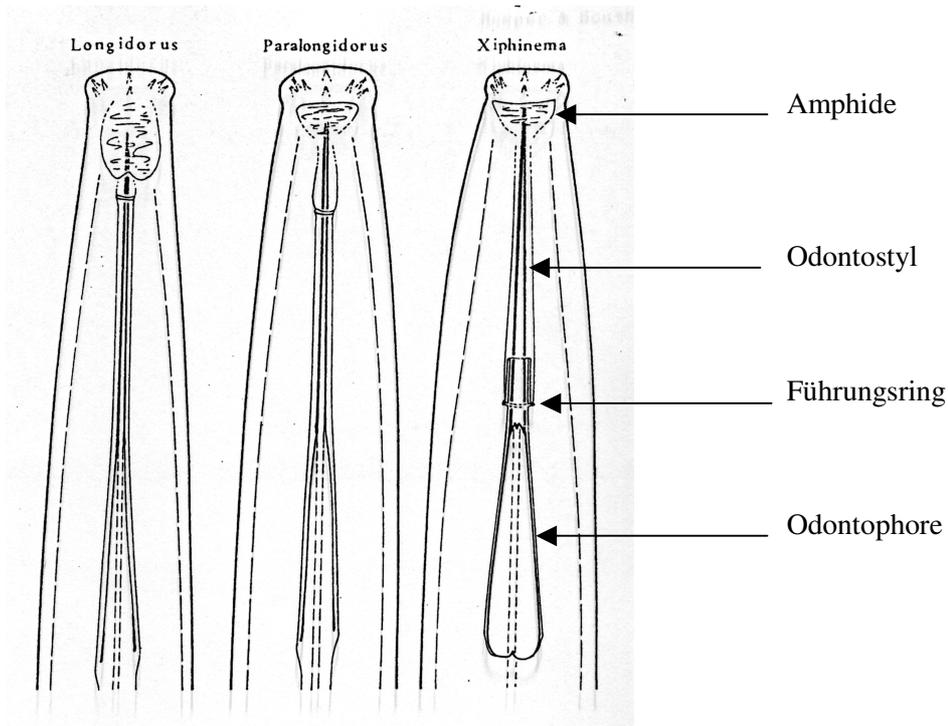


Abb. 2.4: Vordere Körperregion der Longidoridae-Gattungen *Longidorus*, *Paralongidorus* und *Xiphinema* (nach HOOPER und SOUTHEY, 1973, verändert)

Tab. 2.8: Merkmale zur Unterscheidung der Gattungen *Longidorus*, *Paralongidorus* und *Xiphinema* (nach HOOPER und SOUTHEY, 1973)

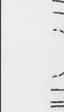
	<i>Longidorus</i>	<i>Paralongidorus</i>	<i>Xiphinema</i>
Amphidenöffnungen	porenähnlich, sehr undeutlich	spaltähnlich, oft breit und deutlich wie bei <i>Xiphinema</i>	spaltähnlich, breit und normalerweise deutlich
Amphidenform	groß, beutelähnlich, oft zweilappig an der Basis	in der Regel kelchförmig wie bei <i>Xiphinema</i> , manchmal wie bei <i>Longidorus</i>	gewöhnlich kelchförmig
Führungsring	einfach, deutlich, im vorderen Bereich des Odontostyls	wie bei <i>Longidorus</i>	doppelt ¹ , weniger deutlich als bei <i>Longidorus</i> , an der Basis des Odontostyls, vorderer Ring meist nicht so deutlich
Verbindung zwischen Odontostyl und Odontophore	einfach, ohne Zacken	wie bei <i>Longidorus</i>	Odontostylbasis gespalten, (2-3 Zacken)
Odontophore	schwach entwickelt, an der Basis nur leicht verdickt, bei konservierten Tieren schwierig zu sehen	wie bei <i>Longidorus</i>	stark entwickelt mit breiten Basallügeln, normalerweise auch bei konservierten Tieren gut sichtbar

¹ auch nur ein Führungsring, aber manchmal wird von einem zweiten gesprochen, obwohl es sich um eine andere Struktur handelt (TAYLOR und BROWN, 1997)

Nachdem die Zuordnung zu einer der drei Gattungen erfolgt war, musste bei *Longidorus* und *Xiphinema* anhand von adulten Tieren die Art bestimmt werden. Bei *Xiphinema* konnte die zur *X. americanum*-Gruppe zählende Art *X. pachtaicum* aufgrund der deutlich geringeren Körpergröße von den übrigen Arten unterschieden werden. *X. diversicaudatum* war wegen der Größe und des Vorhandenseins von Männchen ebenfalls relativ gut zuzuordnen (Tabelle 2.10). Zur Unterscheidung von *X. index* und *X. vuittenezi* diente die Schwanzregion sowie die Lage der Vulva, da sich die meisten Meßwerte überschneiden (Tabellen 2.10 und 2.11). Bei *Longidorus* wurden in der Regel einzelne Adulte ausgemessen und durch die Ermittlung der morphometrischen Daten die Art bestimmt, wobei auch hier vielfach Überschneidungen vorkommen und eindeutige Zuordnungen zu einer Spezies nicht immer ohne weiteres vorzunehmen sind (Tabellen 2.9 und 2.11).

Nach der Bestimmung wurden die Nematoden entweder sofort zur DNA-Extraktion eingesetzt oder zur späteren Verwendung in 1 M NaCl bei -25 °C eingefroren.

Tab. 2.9: Unterscheidungsmerkmale der virusübertragenden *Longidorus*- und *Paralongidorus*-Arten (nach TAYLOR und BROWN, 1997, verändert).
 a= Verhältnis von Körperlänge zu größter Körperbreite; c'= Verhältnis von Schwanzlänge zu Schwanzbreite, gemessen am Anus

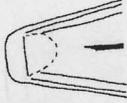
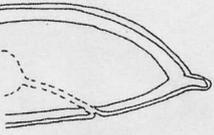
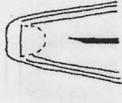
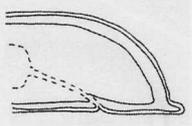
Nematodenart	Länge (mm)	Odontostyl (µm)	a ¹	c' ¹	Körperbreite am Führungsring / Lippenbreite ¹	Kopfregion ²	Schwanzregion ²	Männchen
<i>L. attenuatus</i>	6,1 (5,2-7,3)	78 (73-84)	158 (120-210)	1,7 (1,4-2,0)	1,3 (0,8-1,5)			selten
<i>L. elongatus</i>	5,5 (4,5-6,4)	94 (81-102)	92 (76-123)	1,2 (1,0-1,4)	1,6 (1,4-1,8)			selten ³
<i>L. macrosoma</i>	9,1 (7,9-11,9)	130 (119-148)	95 (77-142)	0,6 (0,5-0,7)	2,9 (2,2-4,1)			häufig
<i>P. maximus</i>	9,8 (7,6-12,4)	172 (152-187)	107 (77-133)	0,6 (0,4-0,8)	1,2 (1,1-1,3)			selten

¹ Die angegebenen Zahlen sind Mittelwerte, in Klammern befinden sich die Spannweiten.

² Die Abbildungen sind jeweils in etwa gleichem Maßstab dargestellt.

³ Normalerweise sind Männchen selten, in manchen Populationen jedoch häufig.

Tab. 2.10: Unterscheidungsmerkmale der virusübertragenden *Xiphinema*-Arten (nach TAYLOR und BROWN, 1997, verändert).
 V= Lage der Vulva, gemessen vom Kopf aus; c'= Verhältnis von Schwanzlänge zu Schwanzbreite, gemessen am Anus;
 Z-Organ= spezielle Struktur im weiblichen Genitaltrakt

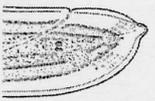
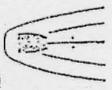
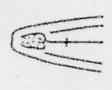
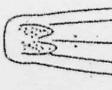
Nematodenart	Länge ¹ (mm)	Odontostyl ¹ (µm)	V ¹ (%)	c' ¹	Z-Organ	Kopfregion ²	Schwanzregion ²	Männchen
<i>X. diversicaudatum</i>	4,9 (4,0-5,5)	143 (130-157)	43 (39-46)	1,0 (0,8-1,2)	ja			häufig
<i>X. index</i>	3,1 (2,9-3,3)	126 (119-129)	39 (38-40)	1,1 (1,0-1,3)	nein			selten

¹ Die angegebenen Zahlen sind Mittelwerte, in Klammern befinden sich die Spannweiten.

² Die Abbildungen sind jeweils in etwa gleichem Maßstab dargestellt.

Tab. 2.11: Charakteristika von vier Nicht-Virusvektoren aus der Familie Longidoridae (nach STURHAN, 2003, persönliche Mitteilung und LUC *et al.*, 1964, verändert)

V= Lage der Vulva, gemessen vom Kopf aus; c= Verhältnis von Schwanzlänge zu Schwanzbreite, gemessen am Anus;
 Z-Organ= spezielle Struktur im weiblichen Genitaltrakt; a= Verhältnis von Körperlänge zu größter Körperbreite

Nematodenart	Länge (mm)	Odontostyl (µm)	V (%)	c'	Z-Organ	Kopfregion	Schwanzregion	Männchen	
<i>X. vuittenezi</i>	2,6-3,8	115-137	46-57	0,8-1,1	nein			selten	
a									
Lippenbreite (µm)									
<i>L. helveticus</i>	6,0-9,3	125-147	62-90	0,5-0,7	20-24			häufig	
<i>L. profundorum</i>	5,7-8,3	88-104	81-138	0,7-1,0	12,5-14,5			häufig	
<i>L. sturthani</i>	4,4-6,4	78-96	100-138	1,0-1,5	14-17			unbekannt	

2.2.2.3 DNA-Extraktion

Die Extraktion der Nematoden-DNA wurde nach dem unter 2.1.2.1 beschriebenen Verfahren durchgeführt, wobei die Inkubation über Nacht jedoch ohne Heizblock bei Zimmertemperatur erfolgte.

2.2.2.4 PCR

Für die PCR wurden 0,2 ml Eppendorf-Gefäße mit jeweils einem Ready-To-Go™ PCR Bead (Amersham Pharmacia Biotech) verwendet.

In jedes dieser Tubes wurden nacheinander

22,5 µl H₂O_{dest.}

0,5 µl extrahierte Nematoden-DNA und jeweils

1,0 µl der beiden Primer (10µM)

pipettiert, so dass sich ein Reaktionsvolumen von insgesamt 25 µl ergab. Die Amplifikationsbedingungen sind Tabelle 2.4 zu entnehmen.

2.2.2.5 Gelelektrophorese

Es wurde ein 1 %iges Agarosegel (0,5 g Agarose auf 50 ml TBE-Puffer, pH 7-8) verwendet, welches vor dem Aushärten mit 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versehen worden war.

Das Gel wurde dann mit TBE-Puffer vollständig überschichtet, bevor meist 5 µl des jeweiligen PCR-Produktes mit 3 µl Beladungslösung (0,25 % Bromphenolblau und 40 % Saccharose in H₂O) vermischt und aufgetragen wurden.

Zusätzlich wurden 3 µl eines 100 bp DNA-Markers (Abbildung 2.5) zum Vergleich der Fragmentgröße verwendet. Die Elektrophorese wurde in der Regel bei 100 Volt ohne Kühlung durchgeführt.

Anschließend wurde das Gel auf dem UV-Transilluminator angesehen, wobei das Ergebnis meist mit Hilfe einer Polaroidkamera dokumentiert wurde.

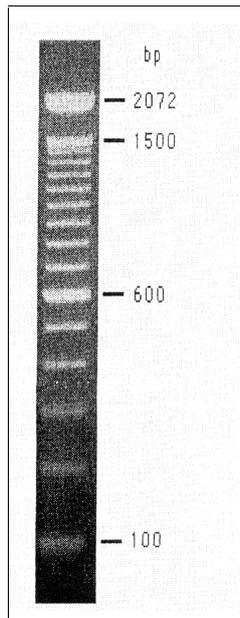


Abb. 2.5: 100 bp DNA-Marker (GIBCO BRL)

2.2.2.6 Reinigung der PCR-Produkte

Zur Reinigung der PCR-Produkte wurde das NucleoSpin[®] Extract Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet. Die Arbeitsschritte erfolgten gemäß Anleitung des Herstellers.

1. Direkte Reinigung der PCR-Produkte (wenn nur eine einzige Bande in der Gelelektrophorese sichtbar war)

Die nach der Gelelektrophorese übriggebliebenen 20 µl des PCR-Produktes wurden mit 30 µl TE-Puffer (pH 7,5) und 200 µl NT2-Puffer (im Kit vorhanden) vermischt.

Dieses Gemisch wurde in die in 2 ml Sammelgefäßen befindlichen NucleoSpin[®] Extract-Säulen eingefüllt. Die Gefäße wurden eine Minute bei 11000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurden die Sammelgefäße entleert und 600 µl NT3-Puffer in die Säulen gegeben. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (1 min bei 11000 x g) wurde erneut die in den Sammelgefäßen befindliche Flüssigkeit verworfen und 200 µl Puffer NT3 in die Säulen pipettiert. Diesmal wurde zwei Minuten lang zentrifugiert, um den Puffer vollständig zu entfernen. Die Sammelgefäße wurden inklusive der darin enthaltenen Flüssigkeit verworfen und die Säulen in neue 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt.

Um die von der in den Säulen befindlichen Membran zurückgehaltene DNA zu eluieren, wurde in der Regel 30 µl NE-Puffer in die Mitte der Membran pipettiert und nach einer Minute Wartezeit eine weitere Minute bei 11000 x g zentrifugiert.

Die so gereinigte DNA wurde entweder bei -25 °C im Gefrierschrank aufbewahrt oder direkt in einer Sequenzierungs-PCR eingesetzt.

2. DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen (bei mehr als einer Bande in der Gelelektrophorese)

Mit Hilfe eines sauberen Skalpells wurde das die DNA enthaltende Gelfragment ausgeschnitten, in ein zuvor gewogenes Eppendorf-Gefäß gegeben und das Gewicht bestimmt. Je mg Agarosegel wurden 3 µl NT1-Puffer hinzugegeben. Anschließend wurden die Gefäße solange bei 50 °C im Heizblock inkubiert, bis die Gelstücke vollständig gelöst waren, wobei alle zwei Minuten die Proben kurz gemischt wurden, um den Lösungsvorgang zu beschleunigen. Die Proben wurden dann auf die in Sammelgefäßen befindlichen NucleoSpin[®] Extract Säulen gegeben und eine Minute lang bei 8000 x g und Zimmertemperatur zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde wiederum verworfen und die Säulen zurück in die Sammelgefäße gestellt. Anschließend wurden die bereits unter Punkt 1 beschriebenen Pufferwasch- (600 und 200 µl NT3) und Zentrifugationsschritte durchgeführt, bevor die DNA nach dem gleichen Verfahren wie oben eluiert wurde.

2.2.2.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung der ITS1-Region erfolgte wie unter 2.1.2.5 beschrieben.

2.2.2.8 Präzipitation der DNA

Die DNA wurde nach der unter 2.1.2.6 aufgeführten Methode in 1,5 ml Reaktionsgefäße gefällt und zur Durchführung von Elektrophorese und anschließender Auswertung an die Firma GENTERprise (Mainz) weitergereicht.

2.2.2.9 Sequenzdatenanalyse

Die vom Sequenzierungslabor bereitgestellten Basenabfolgen wurden mit Hilfe des Softwareprogrammpaketes Lasergene (Version 5) von DNASTAR Inc. analysiert. Dazu wurden die

Sequenzdaten zunächst mit Hilfe von EditSeq in das Programm eingelesen. Die SeqManII-Anwendung erlaubte es dann, die für eine Nematodenart erhaltenen Fragmente der ITS1-Region zusammen in ein Projekt zu kopieren, aneinanderzulagern, zu editieren und eine gemeinsame Konsensussequenz daraus zu erstellen. Anschließend konnten die Konsensusdaten der verschiedenen Nematodenarten mit Hilfe von MegAlign zusammenkopiert und miteinander verglichen werden, um artspezifische Regionen zur Primerkonstruktion ausfindig zu machen.

Die vom Sequenzierungslabor mitgelieferten Sequenzchromatogramme wurden gelegentlich herangezogen, um unklare Positionen noch einmal zu überprüfen. Zu diesem Zwecke wurde das Programm Chromas (Version 1.45) verwendet.

2.2.2.10 Primerdesign

Um die PCR-Methode möglichst einfach zu gestalten, wurde zunächst versucht, den bereits zur Sequenzierung verwendeten universellen Vorwärtsprimer B118 beizubehalten und nur spezifische Rückwärtsprimer für jede Art zu entwickeln. Hierzu wurde innerhalb von artspezifischen Regionen nach Basenabfolgen gesucht, die keine oder nur geringfügige Interaktionen mit der Sequenz von B118 aufweisen, da ansonsten die Gefahr einer gegenseitigen Blockierung der beiden Primer besteht. Mit Hilfe der PrimerSelect-Anwendung von Lasergene konnte zudem getestet werden, ob die ausgewählte Basenfolge zur Bildung von Schleifen neigt oder sich mit sich selbst zusammenlagern und stabile Dimere bilden kann, was ebenfalls eine Hemmung des Primers zur Folge haben könnte. Anschließend wurde überprüft, ob die Nukleotidsequenz zusätzlich an weiteren Stellen als der gewünschten anlagern kann und damit die Gefahr der Bildung unspezifischer Amplifikationsprodukte gegeben ist. Weiterhin wurde darauf geachtet, dass die kalkulierte Schmelztemperatur des potentiellen Primers nicht zu stark von derjenigen von B118 abwich, insbesondere nicht deutlich darunter lag. Bei denjenigen Nematodenarten, die zusammen in einer PCR-Reaktion nachweisbar sein sollten, wurde ferner versucht, die Primer so auszuwählen, dass sich möglichst deutlich verschiedene Fragmentgrößen ergeben. Zusätzlich zu B118 wurde mit Hilfe der 18S-Gendaten ein weiterer universeller Vorwärtsprimer, GenF, konstruiert, wobei ebenfalls die Interaktionen mit der eigenen Sequenz und den übrigen Primern untersucht wurden. Mit der Entwicklung von GenF sollte im Vergleich zu B118 ein etwas spezifischerer Primer zur Verfügung gestellt werden.

2.3 Testung der Primer

2.3.1 Testung der von WANG *et al.* (2003) entwickelten *Xiphinema*-Primer

2.3.1.1 Nachweissicherheit

Bei den von WANG *et al.* (2003) beschriebenen Untersuchungen wurde nur bei *X. vuittenezi* auch eine aus Deutschland stammende Population verwendet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher überprüft werden, ob die veröffentlichten Primer für *X. vuittenezi*, *X. index* und *X. diversicaudatum* zum sicheren Nachweis deutscher Herkünfte geeignet sind.

Verwendet wurden hierzu für jede Art jeweils mehrere Populationen, vorwiegend aus den Weinbaugebieten Pfalz und Rheinhessen, zum Teil auch von Nahe, Mosel, Baden, Franken und der Hessischen Bergstrasse (Tabelle 2.12). In allen Fällen wurden die Nematoden wie beschrieben aus den Bodenproben extrahiert und anschließend anhand morphologischer Merkmale identifiziert. DNA-Extraktion mit einzelnen Tieren, PCR und Gelelektrophorese erfolgten wie unter 2.1.2.1, 2.2.2.4 und 2.2.2.5 beschrieben.

Tab. 2.12: Herkünfte von *Xiphinema diversicaudatum*, *X. index* und *X. vuittenezi* zur Testung der von WANG *et al.* (2003) entwickelten Primer

Nematodenart	Herkunft	Weinbauregion
<i>X. diversicaudatum</i>	Hambach	Pfalz
<i>X. diversicaudatum</i>	Ilbesheim	Pfalz
<i>X. diversicaudatum</i>	Piesport	Mosel
<i>X. diversicaudatum</i>	Schweigen-Rechtenbach	Pfalz
<i>X. index</i>	Bad Dürkheim	Pfalz
<i>X. index</i>	Bissersheim	Pfalz
<i>X. index</i>	Freiburg	Baden
<i>X. index</i>	Haardt	Pfalz
<i>X. index</i>	lphofen	Franken
<i>X. index</i>	Klotten	Mosel
<i>X. index</i>	Nierstein	Rheinhessen
<i>X. vuittenezi</i>	Bad Dürkheim	Pfalz
<i>X. vuittenezi</i>	Bad Kreuznach	Nahe
<i>X. vuittenezi</i>	Bissersheim	Pfalz
<i>X. vuittenezi</i>	Deidesheim	Pfalz
<i>X. vuittenezi</i>	Freinsheim	Pfalz
<i>X. vuittenezi</i>	Haardt	Pfalz
<i>X. vuittenezi</i>	Heppenheim	Hessische Bergstrasse
<i>X. vuittenezi</i>	Kleinniedesheim	Pfalz
<i>X. vuittenezi</i>	Mörzheim	Pfalz
<i>X. vuittenezi</i>	Obrigheim	Pfalz
<i>X. vuittenezi</i>	Ockenheim	Rheinhessen
<i>X. vuittenezi</i>	Undenheim	Rheinhessen
<i>X. vuittenezi</i>	Westhofen	Rheinhessen

2.3.1.2 Spezifität

Zur Überprüfung der Primerspezifität wurde DNA einzelner Nematoden der Arten *Longidorus attenuatus*, *L. elongatus*, *L. helveticus*, *L. macrosoma*, *L. profundorum*, *L. sturhani*, *Paralongidorus maximus* und *X. pachtaicum* ebenso verwendet wie zwei DNA-Mischungen aus nicht näher bestimmten pflanzenparasitären, räuberischen und saprophagen Nematodenarten, die ebenfalls in Weinbergserde vorkommen (Tabelle 2.13).

Tab. 2.13: Zur Testung der *Xiphinema*-Primer eingesetzte Nematodenherkünfte

Nematodenart	Herkunft	Weinbauregion
<i>L. attenuatus</i>	Gau Algesheim	Rheinhessen
<i>L. attenuatus</i>	Mettenheim	Rheinhessen
<i>L. elongatus</i>	Bad Dürkheim	Pfalz
<i>L. elongatus</i>	Heppenheim	Hessische Bergstrasse
<i>L. helveticus</i>	Horrweiler	Nahe
<i>L. helveticus</i>	Stadecken	Rheinhessen
<i>L. macrosoma</i>	Freiburg	Baden
<i>L. macrosoma</i>	Godramstein	Pfalz
<i>L. macrosoma</i>	Heppenheim	Hessische Bergstrasse
<i>L. macrosoma</i>	Knöringen	Pfalz
<i>L. profundorum</i>	Gau Algesheim	Rheinhessen
<i>L. profundorum</i>	Horrweiler	Nahe
<i>L. profundorum</i>	Landau	Pfalz
<i>L. sturhani</i>	Gau Algesheim	Rheinhessen
<i>L. sturhani</i>	Ockenheim	Rheinhessen
<i>P. maximus</i>	Bad Dürkheim	Pfalz
<i>P. maximus</i>	Deidesheim	Pfalz
<i>P. maximus</i>	Hambach	Pfalz
<i>P. maximus</i>	Mußbach	Pfalz
<i>X. pachtaicum</i>	Gau Algesheim	Rheinhessen
<i>X. pachtaicum</i>	Landau	Pfalz

2.3.1.3 Sensitivität

Die spezifischen Primerpaare für *X. index* und *X. diversicaudatum* wurden auf ihre Nachweisgrenze hin getestet. Da in der Praxis mitunter Mischpopulationen vorkommen, stellte sich die Frage, unter wie vielen Individuen von *X. vuittenezi* noch einzelne Virusüberträger (*X. index* bzw. *X. diversicaudatum*) nachweisbar sind. Hierzu wurden zunächst Verdünnungsreihen hergestellt (Tabelle 2.14).

Tab. 2.14: DNA-Mischungen zur Ermittlung der Primersensitivität
 XI = *Xiphinema index*, XD = *X. diversicaudatum*, XV = *X. vuittenezi*

	DNA-Mischung	Verhältnis
1	0,5 µl XI-DNA (oder XD-DNA) + 0,5 µl XV-DNA	1:1
2	0,5 µl XI-DNA (oder XD-DNA) + 1,0 µl XV-DNA	1:2
3	0,5 µl XI-DNA (oder XD-DNA) + 2,5 µl XV-DNA	1:5
4	0,5 µl XI-DNA (oder XD-DNA) + 5,0 µl XV-DNA	1:10
5	0,5 µl XI-DNA (oder XD-DNA) + 12,5 µl XV-DNA	1:25
6	0,5 µl XI-DNA (oder XD-DNA) + 25,0 µl XV-DNA	1:50
7	0,5 µl XI-DNA (oder XD-DNA) + 37,5 µl XV-DNA	1:75
8	0,5 µl XI-DNA (oder XD-DNA) + 50,0 µl XV-DNA	1:100
9	0,5 µl XI-DNA + 0,5 µl XD-DNA + 0,5 µl XV-DNA	1:1:1
10	0,5 µl XI-DNA + 0,5 µl XD-DNA + 25,0 µl XV-DNA	1:1:50
11	0,5 µl XI-DNA + 0,5 µl XD-DNA + 50,0 µl XV-DNA	1:1:100
12	0,5 µl XI-DNA + 0,5 µl XD-DNA + 75,0 µl XV-DNA	1:1:150
13	0,5 µl XI-DNA + 0,5 µl XD-DNA + 100,0 µl XV-DNA	1:1:200
14	0,5 µl XI-DNA + 0,5 µl XD-DNA + 200,0 µl XV-DNA	1:1:400
15	0,5 µl XI-DNA + 0,5 µl XD-DNA + 300,0 µl XV-DNA	1:1:600
16	0,5 µl XI-DNA + 0,5 µl XD-DNA + 350,0 µl XV-DNA	1:1:700
17	0,5 µl XI-DNA + 0,5 µl XD-DNA + 400,0 µl XV-DNA	1:1:800
18	0,5 µl XI-DNA + 0,5 µl XD-DNA + 500,0 µl XV-DNA	1:1:1000

Parallel zu diesen Tests mit DNA-Mischungen wurde versucht, gleichzeitig und in einem Reaktionsgefäß die DNA mehrerer Nematoden zu extrahieren (Tabelle 2.15). Für die Proben 4, 7 und 8 wurde aufgrund der großen Individuenzahlen jeweils die doppelte Menge an Chemikalien eingesetzt (40 µl 0,25 M NaOH-Lösung, 20 µl 0,25 M HCl, 10 µl 0,50 M Tris-HCl (pH 8) und 10 µl 2 %iges Triton X-100).

Tab. 2.15: Zur gemeinsamen DNA-Extraktion verwendete Nematoden

	Verwendete Nematoden	Verdünnung
1	1 <i>X. index</i> (oder <i>X. diversicaudatum</i>) + 1 <i>X. vuittenezi</i>	1:1
2	1 <i>X. index</i> (oder <i>X. diversicaudatum</i>) + 10 <i>X. vuittenezi</i>	1:10
3	1 <i>X. index</i> (oder <i>X. diversicaudatum</i>) + 25 <i>X. vuittenezi</i>	1:25
4	1 <i>X. index</i> (oder <i>X. diversicaudatum</i>) + 100 <i>X. vuittenezi</i>	1:100
5	1 <i>X. index</i> + 1 <i>X. diversicaudatum</i> + 1 <i>X. vuittenezi</i>	1:1:1
6	1 <i>X. index</i> + 1 <i>X. diversicaudatum</i> + 50 <i>X. vuittenezi</i>	1:1:50
7	1 <i>X. index</i> + 1 <i>X. diversicaudatum</i> + 150 <i>X. vuittenezi</i>	1:1:150
8	1 <i>X. index</i> + 1 <i>X. diversicaudatum</i> + 200 <i>X. vuittenezi</i>	1:1:200

Um eine weitere Annäherung an Praxisbedingungen zu erzielen, wurde untersucht, ob sich die beiden Vektorarten auch unter typischerweise in Weinbergböden vorkommenden ganzen Nematodengemeinschaften sicher nachweisen lassen. Zu diesem Zwecke wurden einerseits

solche Nematodengemeinschaften gemeinsam mit jeweils einem Individuum der beiden Arten *X. index* und *X. diversicaudatum* einer DNA-Extraktion unterworfen und andererseits die DNA zunächst getrennt extrahiert und dann gemischt. Für den ersten Teil wurden zwei Gemeinschaften aus verschiedenen Weinbergen in Herxheim (Pfalz), für die DNA-Mischungen eine Nematodengemeinschaft aus Deidesheim (Pfalz) und zwei aus einem Weinberg (beide Mischungen enthielten alle vorkommenden Nematodenarten) in Bad Dürkheim (Pfalz) ausgewählt.

Von allen genannten DNA-Mischungen wurden jeweils 0,5 µl in der PCR eingesetzt. PCR und Gelelektrophorese wurden wie unter 2.2.2.4 und 2.2.2.5 beschrieben durchgeführt.

2.3.2 Testung der *Longidorus*- und *Paralongidorus*-Primer

2.3.2.1 Nachweissicherheit, Spezifität und Sensitivität

Die Primer wurden zunächst mit der zur Sequenzbestimmung verwendeten DNA (Tabelle 2.6) und - sofern vorhanden - mit weiteren Herkünften der gleichen Art getestet. Damit sollte überprüft werden, ob alle Populationen der entsprechenden Spezies sicher nachgewiesen werden können.

Zur Ermittlung der Spezifität wurden die Primer mit DNA artfremder Longidoriden (neben den in Tabelle 2.13 aufgeführten auch *X. index*, *X. vuittenezi* und *X. diversicaudatum*) bzw. den bereits unter 2.3.1.2 erwähnten DNA-Mischungen sonstiger Nematodenarten getestet. Hierbei sollte festgestellt werden, ob mit DNA anderer Nematoden unspezifische Amplifikationsprodukte in der PCR gebildet werden.

Um ferner zu überprüfen, ob DNA der Virusüberträger unter Nichtzielorganismen nachweisbar ist, wurden zum einen jeweils alle Spezies von zwei Nematodengemeinschaften (Wallertheim, Rheinhessen; Biebelnheim, Rheinhessen) gemeinsam mit je einem Individuum jeder der vier Vektorarten einer DNA-Extraktion unterworfen. Daneben wurde die DNA einer weiteren Nematodengemeinschaft (Westhofen, Rheinhessen) extrahiert und erst daran anschließend DNA von jeder der vier Überträgerarten zugegeben.

Die Sensitivität des Nachweises wurde zudem durch die Verwendung unterschiedlicher Nematodenentwicklungsstadien überprüft. Damit sollte beurteilt werden, ob zum Beispiel DNA einer einzigen Larve des ersten Entwicklungsstadiums ausreicht, um die entsprechende Art sicher zu detektieren.

2.3.2.2 Anpassung der PCR-Bedingungen und Möglichkeiten des Multiplexing

Für die Überprüfung der Funktionsfähigkeit der neuen Primer wurde zunächst das in Tabelle 2.4 wiedergegebene Programm verwendet. Um jedoch unspezifische Amplifikationen mit artfremder DNA möglichst zu unterbinden, wurde zum einen die Zyklenzahl reduziert und zum anderen die Anlagerungstemperatur von 57 °C stufenweise erhöht, um herauszufinden, bei welcher Temperatur die Primer noch zuverlässig arbeiten. Beide Parameter sollten so eingestellt werden, dass alle neuen Primerpaare mit den Bedingungen zurecht kommen, um einen gleichzeitigen Einsatz nicht von vorneherein auszuschließen.

Bereits bei der Konstruktion war darauf geachtet worden, dass grundsätzlich mehrere Primer gemeinsam in einem PCR-Ansatz verwendbar sein sollten. Die einzelnen Kombinationsmöglichkeiten wurden nun in Testreihen überprüft.

2.3.3 Einsatz der Primer in der Praxis

Sowohl die von WANG *et al.* (2003) veröffentlichten *Xiphinema*- als auch die *Longidorus*- und *Paralongidorus*-Primer wurden auf ihre Eignung für den Praxiseinsatz geprüft. So werden die in den zu untersuchenden Bodenproben befindlichen Nematoden zur morphologischen Artbestimmung häufig hitzefixiert. Um in Zweifelsfällen eine solche Identifikation bestätigen bzw. überprüfen zu können, stellte sich die Frage, ob die beschriebenen DNA-Extraktions- und PCR-Bedingungen auch bei zuvor hitzefixierten Individuen zuverlässige Ergebnisse liefern. Aus diesem Grunde wurden für jede Longidoridae-Art, für die ein spezifisches Primerpaar zur Verfügung stand, DNA-Extraktionen mit zuvor hitzefixierten Nematoden durchgeführt und diese DNA dann in einer PCR eingesetzt.

Ein in der Praxis besonders wichtiges Problem ist die zuverlässige Zuordnung von Longidoridae-Larven zu einer bestimmten Art. Von einigen Ausnahmen abgesehen, wo zum Beispiel eine Larve im ersten Stadium eine sehr typische Schwanzform aufweist, ist dies in der Regel nicht möglich. Da die DNA jedoch unabhängig vom Entwicklungsstadium eines Organismus in den Zellen vorliegt, sollte mit Hilfe der PCR eine Identifikation auch von juvenilen Nematoden möglich sein. Deshalb wurde die DNA mehrerer Larven aus unterschiedlichen Populationen extrahiert und in der PCR eingesetzt, um so eine Artbestimmung vorzunehmen.

3. Ergebnisse

3.1 Sequenzierung des 18S-Genes

3.1.1 Nematoden

Insgesamt wurden 83 Nematodenpopulationen von mindestens 39 verschiedenen Arten im Bereich des 18S-Genes sequenziert. Eine genaue Anzahl an Nematodenarten kann derzeit nicht angegeben werden, da für manche der Populationen noch keine Artbestimmung anhand morphologischer Merkmale vorgenommen werden konnte. Fünfzig der Populationen gehören zur Gattung *Xiphinema*, neunundzwanzig zu *Longidorus*, zwei zur Gattung *Paralongidorus* und zwei weitere zu den Familien Mononchidae bzw. Belonolaimidae. Es wurden Herkünfte aus insgesamt 19 verschiedenen Ländern der Erde, darunter 14 europäische untersucht.

Zwischen den frisch extrahierten bzw. in 1 M NaCl aufbewahrten Nematoden konnten hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit in den beschriebenen Reaktionen keine Unterschiede festgestellt werden. Dadurch ist die Möglichkeit gegeben, Material ohne Qualitätseinbußen aufzubewahren und zu einem späteren Zeitpunkt weiterzuverarbeiten.

3.1.2 PCR-Produkte

Mit Hilfe der insgesamt fünf verschiedenen Primerkombinationen (2.1.1.2) war es möglich, die 18S-Genregion aller in Tabelle 2.1 und 2.2 aufgelisteten Nematodenpopulationen zu amplifizieren. In Abbildung 3.1 ist beispielhaft ein Ausschnitt aus einer Gelelektrophorese für zwei verschiedene *Xiphinema*-Populationen dargestellt. Die Banden in den Spuren 1-3, 4-6, 7-9 und 10-12 sind jeweils von einem einzelnen Nematoden, wobei immer zwei Nematoden der gleichen Population angehören (Population 1: Spuren 1-6, Population 2: Spuren 7-12). Die DNA jedes Nematoden wurde sowohl mit RN18A/9R (Spuren 1, 4, 7, 10), 22F/13R (Spuren 2, 5, 8, 11) und 2FX/18P (Spuren 3, 6, 9, 12) amplifiziert. Durch Vergleich mit dem links aufgetragenen 1 kb DNA-Marker kann die ungefähre Fragmentlänge abgeschätzt werden.

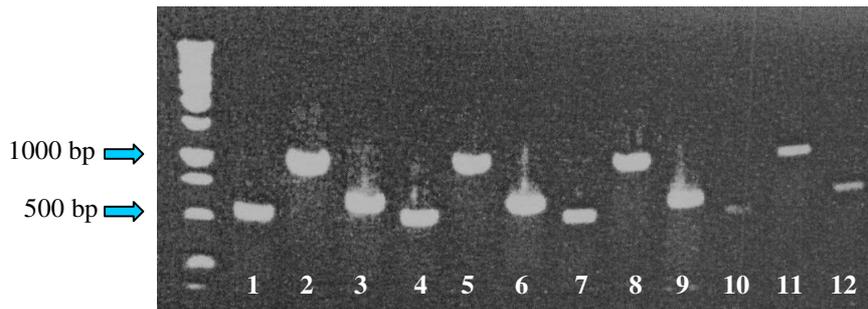


Abb. 3.1: Gelelektrophorese der PCR-Produkte von zwei verschiedenen *Xiphinema*-Populationen (Erklärungen siehe Text)

Abbildung 3.2 zeigt eine Gelelektrophorese für zwei unterschiedliche *Longidorus*-Arten. Auch hier gehören jeweils drei aufeinanderfolgende Banden zu einem Nematoden und es wurden zwei Nematoden pro Population verwendet. Die Reihenfolge des Primereinsatzes ist wie bei den *Xiphinema*-Herkünften (RN18A/9R: Spuren 1, 4, 7, 10; 22F/13R: Spuren 2, 5, 8, 11; 2FX/18P: Spuren 3, 6, 9, 12). Zum Vergleich der Fragmentlänge wurde jeweils links ein 1 kb DNA-Marker aufgetragen.

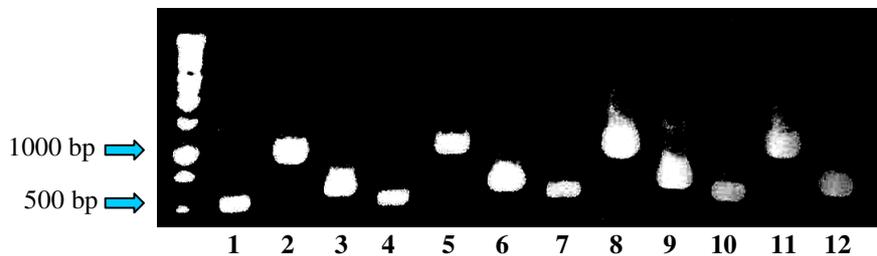


Abb. 3.2: Gelelektrophorese der PCR-Produkte von zwei *Longidorus*-Arten (Erklärungen siehe Text)

Für alle untersuchten Nematodenpopulationen ergaben sich bei Verwendung der einzelnen Primerpaare Fragmente ähnlicher Länge (Tabelle 3.1). Hierbei war kein Unterschied zwischen Arten aus verschiedenen Gattungen feststellbar.

Tab. 3.1: Verwendete Primerpaare und Länge der zugehörigen PCR-Produkte

Primerpaar	Fragmentlänge
RN18A / 9R	ca. 550 bp
G18S4 / 9R	ca. 550 bp
22F / 13R	ca. 1000 bp
2FX / 18P	ca. 650 bp
23F / 18P	ca. 450 bp

3.1.3 Sequenzierung

Die nach erfolgter Sequenzierung erhaltenen Basenabfolgen waren je nach Qualität und Reinheit der präzipitierten DNA von unterschiedlicher Länge. Aus diesem Grunde lassen sich hier keine Größenangaben für die zur weiteren Analyse verwendeten DNA-Fragmente machen.

Wie aus der Anordnung der Anlagerungsstellen der Primer (Abbildung 2.1) zu erkennen ist, gibt es DNA-Bereiche, die jeweils von zwei unterschiedlichen Primerpaaren amplifiziert werden. Die dadurch entstehenden Überlappungen sind notwendig, um die Sequenzen hinterher so zusammenlagern zu können, dass sie gemeinsam den gesamten 18S-Genbereich überspannen (Abbildung 3.3).

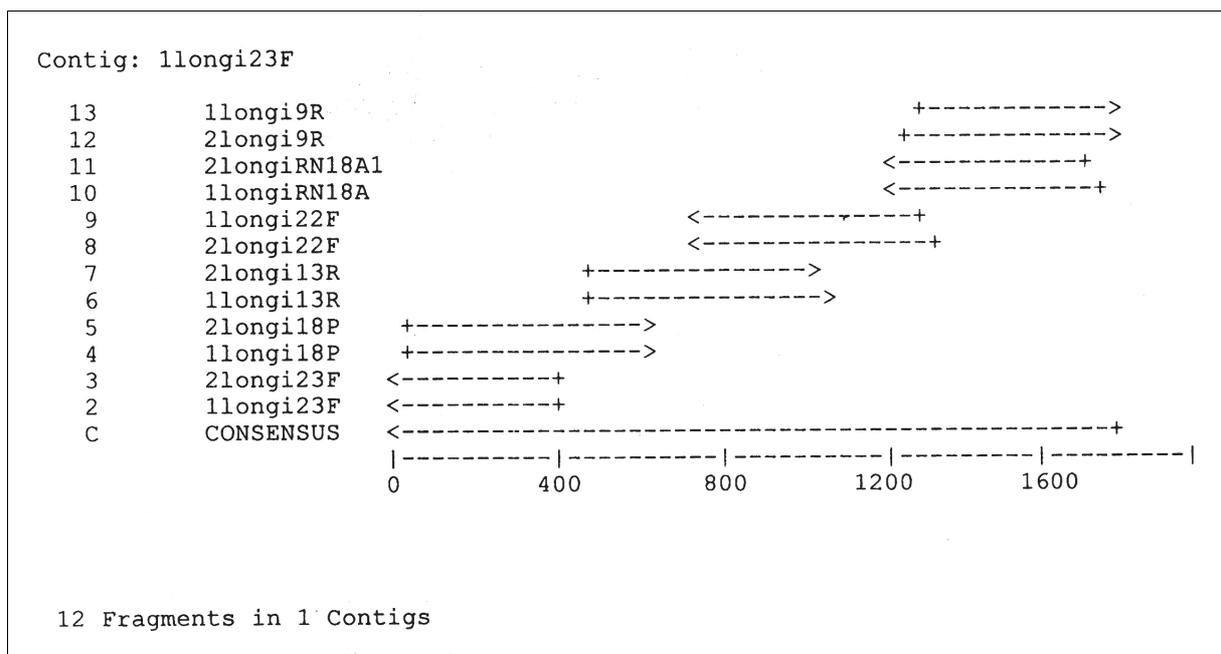


Abb. 3.3: Zusammenlagerung von einzelnen Sequenzfragmenten mit Hilfe des GCG-Software-Paketes zu einem Gesamtkonsensus am Beispiel einer *Longidorus*-Herkunft

Da von jeder Nematodenpopulation mindestens zwei Tiere sequenziert und die 18S-Genregion für jeden Nematoden mit Hilfe von drei Primerpaaren (= 6 verschiedene Primer) amplifiziert wurde, befanden sich in der Regel mindestens 12 Fragmente in einer Datei, bevor die in Abbildung 3.3 gezeigte Zusammenlagerung der DNA-Sequenzen durchgeführt werden konnte. Dadurch wird gewährleistet, dass jede Base in der sich ergebenden Konsensussequenz durch mindestens 2 Einzelfragmente abgesichert ist. Für alle untersuchten Nematodenherkünfte ergaben sich ca. 1750 bp lange Konsensussequenzen, die dann miteinander verglichen werden konnten.

3.1.4 Sequenzdatenanalyse

3.1.4.1 Allgemein

Zwischen den untersuchten Populationen einer Art konnten in vorliegender Arbeit keine Unterschiede in der 18S-Gen-Sequenz festgestellt werden, nicht einmal dann, wenn eine deutliche geographische Distanz zwischen ihnen vorlag. So waren die acht verschiedenen *X. diversicaudatum*-, die elf unterschiedlichen *X. index*- und die vier *X. vuittenezi*-Herkünfte (Tabelle 2.1) jeweils identisch.

Zwischen den Arten einer Gattung traten in der Regel mehr oder weniger große Sequenzvariationen auf, wobei es sich meist um Punktmutationen handelte.

Deutlicher waren die Unterschiede zwischen Arten aus verschiedenen Gattungen ausgeprägt und noch höhere Variation trat auf, wenn Arten aus verschiedenen Familien miteinander verglichen wurden. So zeigten *Mononchus aquaticus* und *Belonolaimus longicaudatus* die größten Sequenzabweichungen von den zu den drei Gattungen aus der Familie Longidoridae gehörenden Herkünften.

Für die weiteren Datenauswertungen, insbesondere die phylogenetischen Analysen, wurden von jeder Art nur noch eine Herkunft bzw. die aus den einzelnen Populationen gebildeten Konsensussequenzen verwendet. Noch unidentifizierte Herkünfte (*L. sp.* und *X. sp.*, Tabelle 2.2) wurden ausgeschlossen und von den insgesamt vier *X. americanum sp.* aus China wiesen drei genau identische Sequenzen auf und sind im folgenden als *X. americanum sensu lato 1* bezeichnet, die vierte Population wird *X. americanum s.l. 2* genannt. Zusätzlich dazu wurden die Sequenzen der Arten *L. attenuatus*, *L. sturhani* und *L. profundorum*, die von C.M.G. Oliveira am SCRI erarbeitet worden waren, in die Analysen mit aufgenommen. Insgesamt wur-

den also 42 Spezies aus der Familie der Longidoridae analysiert, darunter 22 *Longidorus*-, 18 *Xiphinema*- und 2 *Paralongidorus*-Arten.

Das Gesamtalignment umfasst 1753 bp, wovon 1540 identisch bei allen 42 Arten sind (87,85 %). Die Länge der 18S-Sequenzen bei gemeinsamem Anfangs- und Endpunkt variiert von 1746 bp bei *L. camelliae* bis zu 1753 bp bei einigen *Xiphinema*-Spezies. Beim Vergleich der 22 *Longidorus*-Arten fanden sich 129 Unterschiede (92,64 % Homologie), bei den 18 *Xiphinema*-Spezies traten an 146 Positionen Differenzen auf (91,67 % Homologie). Die zwei *Paralongidorus*-Arten zeigten nur 14 Unterschiede und waren damit zu 99,20 % identisch.

Innerhalb der insgesamt als konserviert zu bezeichnenden 18S-Region ließen sich Bereiche mit verschieden starker Variabilität unterscheiden. So gab es sowohl Sequenzabschnitte, die vollkommen homogen für alle untersuchten Nematodenpopulationen waren (z.B. Positionen 300-450, 840-890, 930-1010, 1040-1180, 1210-1280, 1370-1450, 1490-1530, 1560-1640, 1720-1753) als auch solche, die verhältnismäßig viele Unterschiede aufwiesen (z.B. Positionen 120-150, 180-200, 600-700, 1310-1340, 1450-1490, 1650-1690).

An insgesamt 5 Positionen (634, 646, 656, 677 und 686) sind die *Xiphinema*-Arten untereinander einheitlich, unterscheiden sich aber von allen anderen Arten, wobei *Longidorus* und *Paralongidorus* identische Basen aufweisen.

3.1.4.2 Virusüberträger im deutschen Weinbau

Die Sequenzen des 18S-Genes von allen sechs Vektorarten im deutschen Weinbau wurden miteinander verglichen. Die Daten von *L. attenuatus* (England) waren dabei von C.M.G. Oliveira am SCRI erarbeitet und freundlicherweise für diese Analysen zur Verfügung gestellt worden. Der Sequenzdatenvergleich ist in Tabelle 3.2 wiedergegeben.

An insgesamt 113 von 1753 Positionen konnten Unterschiede festgestellt werden (6,45 %), die übrigen 1640 Basen waren bei allen sechs Nematodenarten konstant (93,55 %).

Zwischen *Xiphinema index* und *X. diversicaudatum* ergab sich eine Homologie von 99,03 %. Bei den *Longidorus*-Arten waren 97,49 % aller Basen identisch, wobei *L. attenuatus* die größte Ähnlichkeit mit *L. elongatus* aufwies (99,49 %) und gleichzeitig die größte Diskrepanz zu *L. macrosoma* (97,49 % Homologie). Die Sequenz von *Paralongidorus maximus* zeigte weniger Unterschiede zu denjenigen der *Longidorus*-Arten (97,72-97,89 %) als zu denjenigen der beiden *Xiphinema*-Arten (95,32 bzw. 95,66 %). Den höchsten Grad an Übereinstimmung gab es demnach zwischen *L. attenuatus* und *L. elongatus* (99,49 %), den geringsten zwischen *Paralongidorus maximus* und *Xiphinema index* (95,32 %).

Wenn man die Unterschiede zwischen den einzelnen Arten einer Gattung genauer betrachtet, fällt auf, dass bei den *Xiphinema*-Arten ausschließlich einzelne Basensubstitutionen vorkommen, während man bei den *Longidorus*-Arten sowohl einzelne als auch aufeinanderfolgende Basensubstitutionen, Deletionen und Inversionen findet (Tabellen 3.3-3.6).

Tabelle 3.2: Anzahl der Unterschiede im 18S-Gen zwischen den Virusüberträgern im deutschen Weinbau bei gemeinsamem Start- und Endpunkt der Sequenzen (Gesamtlänge des Alignments: 1753 bp)

	<i>L. attenuatus</i>	<i>L. elongatus</i>	<i>L. macrosoma</i>	<i>P. maximus</i>	<i>X. diversicaudatum</i>	<i>X. index</i>
<i>L. attenuatus</i>	0	9	44	38	73	79
<i>L. elongatus</i>	9	0	38	37	71	78
<i>L. macrosoma</i>	44	38	0	40	73	76
<i>P. maximus</i>	38	37	40	0	76	82
<i>X. diversicaudatum</i>	73	71	73	76	0	17
<i>X. index</i>	79	78	76	82	17	0

Tab. 3.3: Anzahl, Position und Art der Unterschiede zwischen *X. diversicaudatum* (XD) und *X. index* (XI) im 18S-Gen
 A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin

Nr.	XD	XI	Position	Substitution
1	A	G	83	Transition
2	T	G	141	Transversion
3	C	A	144	Transversion
4	T	C	196	Transition
5	T	C	629	Transition
6	T	A	652	Transversion
7	C	T	683	Transition
8	A	T	818	Transversion
9	C	T	1186	Transition
10	C	T	1314	Transition
11	G	A	1338	Transition
12	G	A	1340	Transition
13	T	G	1362	Transversion
14	C	T	1452	Transition
15	A	T	1470	Transversion
16	T	G	1669	Transversion
17	C	T	1680	Transition

Tab. 3.4: Anzahl, Position und Art der Unterschiede zwischen *L. attenuatus* (LA) und *L. elongatus* (LE) im 18S-Gen
 A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin, K: G oder T, M: A oder C, R: A oder G

Nr.	LA	LE	Position	Änderung
1	K	A	79	Transition oder Transversion
2	M	T	80	Transition oder Transversion
3	R	A	83	Transition oder identisch
4	R	A	126	Transition oder identisch
5	C	/	234	Insertion / Deletion
6	C	T	668	Transition
7	T	A	678	Transversion
8	R	G	699	Transition oder identisch
9	G	A	1648	Transition
10	G	T	1651	Transversion
11	A	G	1652	Transition
12	T	G	1708	Transversion

Tab. 3.5: Anzahl, Position und Art der Unterschiede zwischen *L. attenuatus* (LA) und *L. macrosoma* (LM) im 18S-Gen
A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin, K: G oder T, M: A oder C, R: A oder G

Nr.	LA	LM	Position	Änderung
1	K	C	79	Transition oder Transversion
2	M	G	80	Transition oder Transversion
3	R	T	83	Transversion
4	T	C	91	Transition
5	A	G	122	Transition
6	R	A	126	Transition oder identisch
7	A	T	131	Transversion
8	G	T	137	Transversion
9	A	G	138	Transition
10	T	C	140	Transition
11	C	G	183	Transversion
12	/	A	189	Deletion / Insertion
13	T	G	196	Inversion
14	G	T	197	
15	T	C	222	Transition
16	C	/	234	Insertion / Deletion
17	A	T	236	Transversion
18	T	G	277	Transversion
19	C	T	451	Inversion
20	T	C	452	
21	A	G	592	Transition
22	T	C	611	Transition
23	A	T	614	Transversion
24	T	C	627	Transition
25	C	T	642	Transition
26	T	C	661	Transition
27	A	G	662	Transition
28	C	T	668	Transition
29	G	A	669	Transition
30	T	A	678	Transversion
31	C	T	680	Transition
32	R	A	699	Transition oder identisch
33	T	A	743	Transversion
34	T	C	745	Transition
35	A	T	1021	Transversion
36	T	A	1322	Transversion
37	G	A	1332	Transition
38	A	T	1484	Transversion
39	G	A	1531	Transition
40	G	A	1648	Transition
41	G	A	1649	Transition
42	G	T	1651	Transversion
43	A	G	1652	Transition
44	T	A	1654	Transversion
45	G	A	1676	Transition
46	T	G	1708	Transversion

Tab. 3.6: Anzahl, Position und Art der Unterschiede zwischen *L. elongatus* (LE) und *L. macrosoma* (LM) im 18S-Gen
 A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin

Nr.	LE	LM	Position	Änderung
1	A	C	79	Transversion
2	T	G	80	Transversion
3	A	T	83	Transversion
4	T	C	91	Transition
5	A	G	122	Transition
6	A	T	131	Transversion
7	G	T	137	Transversion
8	A	G	138	Transition
9	T	C	140	Transition
10	C	G	183	Transversion
11	/	A	189	Deletion/Insertion
12	T	G	196	Inversion
13	G	T	197	
14	T	C	222	Transition
15	A	T	236	Transversion
16	T	G	277	Transversion
17	C	T	451	Inversion
18	T	C	452	
19	A	G	592	Transition
20	T	C	611	Transition
21	A	T	614	Transversion
22	T	C	627	Transition
23	C	T	642	Transition
24	T	C	661	Transition
25	A	G	662	Transition
26	G	A	669	Transition
27	C	T	680	Transition
28	G	A	699	Transition
29	T	A	743	Transversion
30	T	C	745	Transition
31	A	T	1021	Transversion
32	T	A	1322	Transversion
33	G	A	1332	Transition
34	A	T	1484	Transversion
35	G	A	1531	Transition
36	G	A	1649	Transition
37	T	A	1654	Transversion
38	G	A	1676	Transition

Bei den *Xiphinema*-Arten überwiegen die Transitionen, also Änderungen jeweils innerhalb einer der beiden Basengruppen, mit 58,82 % im Vergleich zu den Transversionen, also Substitutionen einer Purinbase durch eine Pyrimidinbase oder umgekehrt (41,18 %). Beim Vergleich der *Longidorus*-Arten werden die grau hinterlegten Tabelleneinträge nicht als Unterschiede gewertet, da die Möglichkeit besteht, dass die Nukleotide identisch sind. Bei *L. atte-*

nuatus war es an insgesamt fünf Positionen nicht möglich, eine eindeutige Zuordnung zu einer der vier Basen vorzunehmen, da innerhalb der Sequenzfragmente Unterschiede an ein und derselben Position auftraten. Auch eine nochmalige Überprüfung der Sequenzchromatogramm-Peaks konnte keine Entscheidung bringen (C.M.G. Oliveira, persönliche Mitteilung). So ergibt sich für den Vergleich zwischen *L. attenuatus* und *L. elongatus* ohne Berücksichtigung dieser fraglichen Positionen ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Transitionen und Transversionen. Zusätzlich dazu konnte eine Deletion bei *L. elongatus* festgestellt werden. Von den 44 Unterschieden zwischen *L. attenuatus* und *L. macrosoma* (Tabelle 3.5) sind die beiden ersten nicht eindeutig zuzuordnen, ansonsten kommen 21 Transitionen (47,73 %), 15 Transversionen (34,09 %), zwei Insertionen bzw. Deletionen und zwei Inversionen vor. Beim Vergleich zwischen *L. elongatus* und *L. macrosoma* fanden sich 19 Transitionen und 14 Transversionen (50,00 bzw. 36,84 %), eine Deletion bei *L. elongatus* und zwei Inversionen. Änderungen innerhalb einer Basengruppierung kommen damit in drei der vier Vergleiche häufiger vor als Wechsel zwischen Purin- und Pyrimidinbasen. Verglichen mit den beiden *Xiphinema*-Arten (1753 bp) weisen die übrigen vier Virusvektoren Deletionen auf, *P. maximus* mit fünf die meisten (1748 bp Gesamtlänge), gefolgt von *L. elongatus* mit vier (1749 bp Gesamtlänge) und *L. attenuatus* und *L. macrosoma* mit jeweils drei (1750 bp Gesamtlänge). Im 18S-Gen fanden sich neben ausgedehnten hochkonservierten Bereichen auch solche mit etwas größerer Variabilität. Zu den letztgenannten gehören die Regionen zwischen etwa 120 und 160 bp, 180 und 200 bp, 590 und 710 bp, 1310 und 1350 bp, 1450 und 1490 bp und 1640 und 1680 bp. An insgesamt 60 Positionen kommen gattungsspezifische Muster vor (Tabelle 3.7), wobei Base 197 doppelt aufgeführt ist, da hier sowohl die *Xiphinema*- als auch die *Paralongidorus*-Arten verschieden von allen anderen, die *Longidorus*-Arten allerdings untereinander nicht einheitlich sind.

Tab. 3.7: Position und Anzahl gattungsspezifischer Muster im 18S-Gen bei den sechs Virusvektorarten im deutschen Weinbau

	<i>Xiphinema</i> verschieden von allen anderen	<i>Longidorus</i> verschieden von allen anderen	<i>Paralongidorus</i> verschieden von allen anderen	alle Gattungen verschieden voneinander
Position(en)	33, 132, 153, 195, 197, 249, 602, 603, 605, 606, 633, 645, 655, 658, 665, 676, 685, 690, 695, 696, 732, 743, 747, 810, 811, 1026, 1313, 1322, 1330, 1333, 1456, 1653, 1654, 1660, 1663, 1666, 1668, 1670, 1673, 1675, 1677, 1678, 1702	677	131, 137, 187, 188, 190, 197, 682, 683, 684, 813, 1329, 1458, 1459, 1476, 1649	142, 1455
Gesamtzahl	43	1	15	2

Am häufigsten unterscheiden sich demnach die beiden *Xiphinema*-Arten von den übrigen vier Vektoren. Deutlich weniger Unterschiede liegen zwischen *Paralongidorus* und den übrigen fünf Spezies vor. An nur zwei Positionen der 18S-Gen-Sequenz sind Differenzen zwischen allen drei Gattungen zu beobachten und nur ein einziges Mal unterscheiden sich die drei *Longidorus*-Arten von den *Paralongidorus*- und *Xiphinema*-Spezies.

Die Anzahl der einzelnen Nukleotide, dargestellt durch die jeweiligen Basen, ist in Tabelle 3.8 angegeben, ebenso wie die daraus resultierenden GC- und AT-Gehalte.

Die unterschiedliche Länge der einzelnen Sequenzen ist begründet durch verschieden häufig vorkommende Deletionen bei den *Longidorus*- und *Paralongidorus*-Arten im Vergleich zu den *Xiphinema*-Spezies.

Was die Basenzusammensetzungen innerhalb des 18S-Genes angeht, so sind keine bedeutenden Unterschiede zwischen den sechs Nematodenarten feststellbar (Tabelle 3.8). Tendenziell gesehen haben die *Xiphinema*-Spezies etwas mehr A-Nukleotide, dafür aber weniger T-Nukleotide. Die GC- bzw. AT-Werte sind sehr ähnlich zwischen allen Arten. Im Mittel liegen die GC-Gehalte nicht ganz 6 % unterhalb der AT-Gehalte.

Tabelle 3.8: Anzahl der einzelnen Basen, sowie GC- und AT-Gehalt im 18S-Gen (kalkuliert mit Hilfe von BioEdit 4.8.4)
 Die Sequenzen haben einen gemeinsamen Anfangs- und Endpunkt, die Gesamtlänge des Alignments ist 1753 bp.
 A= Adenin, C= Cytosin, G= Guanin, T= Thymin, K= G oder T, M= A oder C, R= A oder G

	Anzahl Basen	A	C	G	T	K	M	R	GC-Gehalt (in %)	AT-Gehalt (in %)
<i>L. attenuatus</i>	1750	479	366	455	445	1	1	3	46,91	52,80
<i>L. elongatus</i>	1749	483	364	456	446	0	0	0	46,88	53,12
<i>L. macrosoma</i>	1750	482	369	456	443	0	0	0	47,14	52,86
<i>P. maximus</i>	1748	482	371	450	445	0	0	0	46,97	53,03
<i>X. diversicaudatum</i>	1753	493	374	452	434	0	0	0	47,12	52,88
<i>X. index</i>	1753	494	370	454	435	0	0	0	47,01	52,99

Vergleicht man die prozentualen Anteile der einzelnen Nukleotide - dargestellt durch ihre jeweiligen Basen - miteinander (Abbildung 3.4), so fällt auf, dass diejenigen mit der Base Adenin mit durchschnittlich 27,73 % am häufigsten, diejenigen mit Cytosin mit etwa 21,08 % am seltensten vorkommen. Dazwischen befinden sich die Werte für die Guanin-Nukleotide mit durchschnittlich ca. 25,93 % und für die Thymin-Nukleotide mit ungefähr 25,21 %.

Innerhalb der Nukleotidgruppen treten die größten Schwankungen zwischen den sechs Nematodenarten bei A (0,81 %), die geringsten bei G (0,33 %) auf. Die Werte für Cytosin (0,52 %) und Thymin (0,74 %) liegen dazwischen. Alle diese Angaben entsprechen Näherungswerten, da sich aufgrund der fünf nicht näher bestimmbaren *L. attenuatus*-Basen geringfügige Differenzen ergeben könnten.

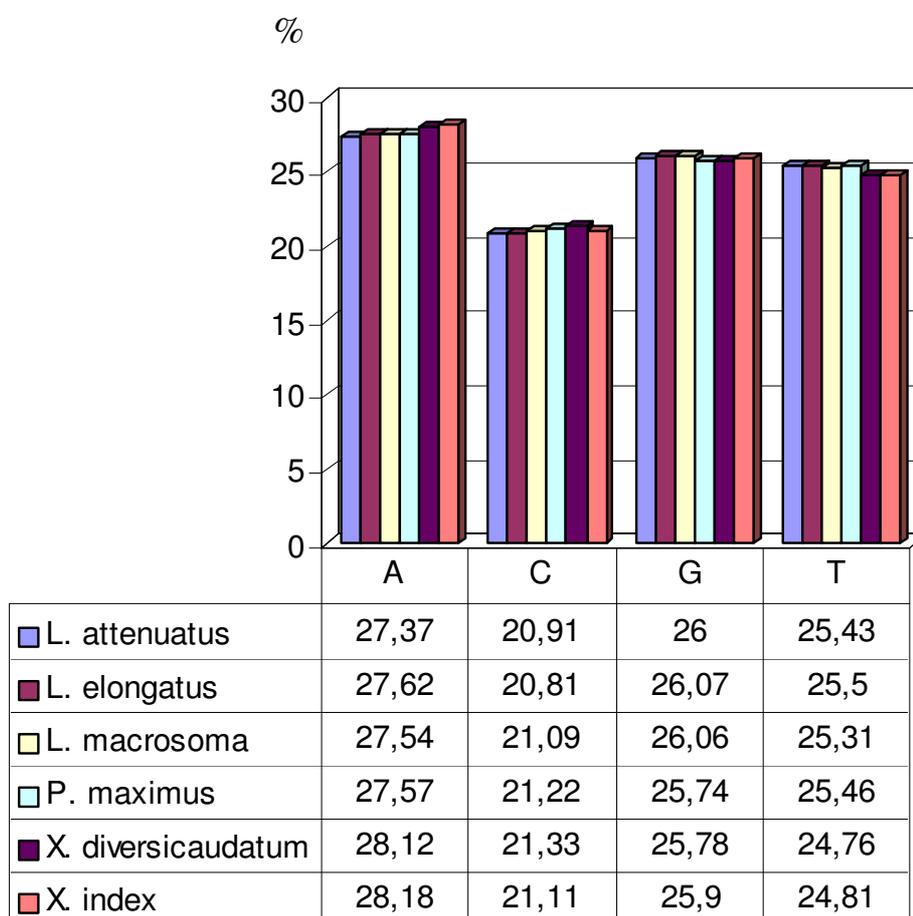


Abb. 3.4: Vergleich der Basenzusammensetzung (in %) innerhalb des 18S-Genes zwischen den sechs Virusvektorarten im deutschen Weinbau
A= Adenin, C= Cytosin, G= Guanin, T= Thymin

Die Analyse der Sequenzdaten zeigt deutlich, dass innerhalb der 18S-Gen-Region nicht genügend Unterschiede vorliegen, um artspezifische Primer konstruieren zu können. Dabei ist we-

niger die absolute Anzahl an Differenzen von Bedeutung als vielmehr deren Verteilung. Für die Konstruktion von spezifischen Primern müssten die vorhandenen Unterschiede nämlich in räumlich dichter Folge vorkommen und arttypische Regionen bilden.

3.1.4.3 Vergleich zwischen einigen Virusüberträgern und morphologisch ähnlichen Arten

Neben den virusübertragenden Nematodenarten kommen in deutschen Weinbergböden noch weitere Longidoriden vor, bei denen bislang keine Übertragung nachgewiesen werden konnte, die den Vektorarten jedoch teilweise sehr ähnlich sehen. Aus diesem Grund sollte festgestellt werden, ob sich diese Ähnlichkeiten auch auf molekularer Ebene widerspiegeln.

Beim Vergleich zwischen *X. index* mit *X. vuittenezi* ergaben sich insgesamt 20 Unterschiede in der 18S-Gensequenz (98,86 % Homologie) und damit geringfügig mehr als zwischen den beiden virusübertragenden *Xiphinema*-Arten. Auch hierbei kamen ausschließlich Basensubstitutionen vor, mit einer Ausnahme (Positionen 1313/1314) handelte es sich hierbei um einzelne, nicht direkt aufeinanderfolgende Basen (Tabelle 3.9).

Tab. 3.9: Anzahl, Position und Art der Unterschiede zwischen *X. index* (XI) und *X. vuittenezi* (XV) im 18S-Gen
A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin

Nr.	XI	XV	Position	Substitution
1	A	T	25	Transversion
2	T	G	33	Transversion
3	T	C	142	Transition
4	A	G	197	Transition
5	A	G	249	Transition
6	C	T	613	Transition
7	T	C	683	Transition
8	T	C	1186	Transition
9	A	C	1313	Transversion
10	T	C	1314	Transition
11	A	G	1318	Transition
12	T	C	1334	Transition
13	A	G	1338	Transition
14	A	G	1340	Transition
15	T	C	1452	Transition
16	T	A	1470	Transversion
17	A	G	1653	Transition
18	C	T	1663	Transition
19	G	A	1670	Transition
20	T	C	1680	Transition

Mit 80 % überwiegen deutlich die Transitionen im Vergleich mit den Transversionen (20 %). Von der Verteilung der Unterschiede her lassen sich auch hier wieder hochkonservierte Bereiche (z.B. Positionen 250–610, 690–1180) und etwas variabelere Regionen unterscheiden (z.B. 1310–1340, 1650–1680).

Insgesamt 15 Unterschiede traten auf zwischen *L. elongatus* und *L. sturhani* (99,14 % Homologie), wobei neben Basensubstitutionen (7 Transitionen, 4 Transversionen) auch zwei Insertionen/Deletionen und eine Inversion zu finden waren (Tabelle 3.10).

Tab. 3.10: Anzahl, Position und Art der Unterschiede zwischen *L. elongatus* (LE) und *L. sturhani* (LS) im 18S-Gen
A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin

Nr.	LE	LS	Position	Änderung
1	A	C	79	Transversion
2	T	G	80	Transversion
3	A	G	83	Transition
4	A	/	131	Insertion/Deletion
5	C	T	195	Inversion
6	T	C	196	
7	/	T	235	Deletion/Insertion
8	A	C	833	Transversion
9	G	A	1335	Transition
10	A	T	1455	Transversion
11	G	A	1459	Transition
12	G	A	1652	Transition
13	G	A	1655	Transition
14	C	T	1666	Transition
15	T	C	1681	Transition

Beim Vergleich zwischen *L. macrosoma* und *L. helveticus* schließlich konnten nur zwei Transitionen an den Positionen 682 (LM: T, LH: C) und 1459 (LM: G, LH: A) beobachtet werden (99,89 % Homologie).

3.1.5 Phylogenetische Analyse

Die phylogenetische Analyse wurde zum einen nur mit den sechs Virusüberträgerarten im deutschen Weinbau, dann zusammen mit vier weiteren in Weinbergsböden vorkommenden Longidoriden und schließlich mit allen 42 zuvor genannten Nematodenarten durchgeführt. Als „outgroup“ wurde jeweils *Mononchus aquaticus* verwendet, da die Mononchida bei der von BLAXTER *et al.* (1998) veröffentlichten Phylogenie des Stammes Nematoda benachbart zu den beiden Longidoridae-Arten vorkommen.

3.1.5.1 Analyse der Virusvektoren

Bei der phylogenetischen Analyse der 18S-Sequenzdaten der sechs Vektorarten im deutschen Weinbau ergab sich der in Abbildung 3.5 gezeigte Stammbaum. Wie deutlich zu erkennen ist, gibt es zwei Hauptgruppen, die beide statistisch signifikant sind. Die Einordnung der Arten *Xiphinema diversicaudatum* und *X. index* in eine gemeinsame Gruppe erfolgte in 94 von 100 Einzelanalysen. Die zweite Gruppe, die die übrigen vier Virusüberträger-Spezies enthält, wurde in 56 % der Fälle gebildet, wobei *Longidorus elongatus* und *L. attenuatus* in 91 von 100 Analysen zusammengruppiert wurden, *L. macrosoma* und *Paralongidorus maximus* hingegen weisen einen Bootstrap-Wert von unter 50 auf und stellen damit keine verlässliche Einordnung dar. Betrachtet man die einzelnen Gruppen, so stellt man fest, dass die Arten entsprechend ihrer Morphologie gruppiert sind: die beiden *Xiphinema*-Spezies zusammen, ebenso wie die beiden kleineren und dünneren *Longidorus*-Arten bzw. die beiden großen und kräftigen Nematoden *L. macrosoma* und *P. maximus*.

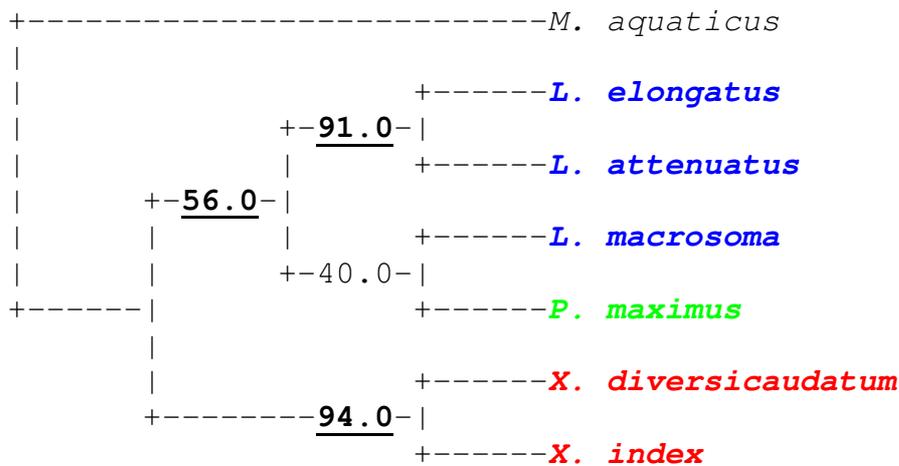


Abb. 3.5: Konsensusstammbaum der sechs Virusvektorarten mit *Mononchus aquaticus* als „outgroup“. Die angegebenen Zahlen stellen die Bootstrap-Werte dar.

3.1.5.2 Analyse der Virusvektoren zusammen mit weiteren Arten aus Weinbergsböden

Die phylogenetische Analyse der insgesamt 10 Longidoridae-Arten ergab den in Abbildung 3.6 dargestellten Stammbaum. Auch in diesem Fall trat eine statistisch signifikante Gruppe für die *Xiphinema*-Arten auf, wobei die beiden virusübertragenden Arten ebenfalls mit einer statistischen Absicherung zusammengruppiert wurden. Die zweite Großgruppe, die neben sechs *Longidorus*-Spezies auch *P. maximus* enthält, weist hingegen einen Bootstrap-Wert von

knapp unter 50 auf. In 81 von 100 Einzelanalysen wurden die vier Arten *L. profundorum*, *L. elongatus*, *L. attenuatus* und *L. sturhani* gemeinsam eingruppiert, wobei die Verhältnisse innerhalb dieser Einordnung nicht mit Sicherheit geklärt sind. Auch die in Abbildung 3.5 dargestellte hochsignifikante Einordnung von *L. attenuatus* mit *L. elongatus* wird in dieser Analyse nicht bestätigt. *L. helveticus* und *L. macrosoma* wurden in 98 von 100 Fällen zusammen eingruppiert, während *P. maximus* nur in 30 % der Analysen dieser Gruppe zugeordnet wurde. Auch bei diesem Stammbaum ergibt sich ein gewisser Zusammenhang zwischen der Morphologie der Arten und ihrer Einordnung anhand von 18S-Daten: so gibt es neben einer *Xiphinema*-Gruppe jeweils eine Gruppierung für die großen und relativ gedrungeneren Arten *P. maximus*, *L. macrosoma* und *L. helveticus* mit einem abgerundeten Schwanz und einem c'-Wert (Verhältnis von Schwanzlänge zu Schwanzbreite) von unter 1 bzw. für die kleineren und dünneren *Longidorus*-Spezies mit spitzeren und längeren Schwänzen, wobei *L. profundorum* etwas dazwischen steht (Tabellen 2.9 und 2.11).

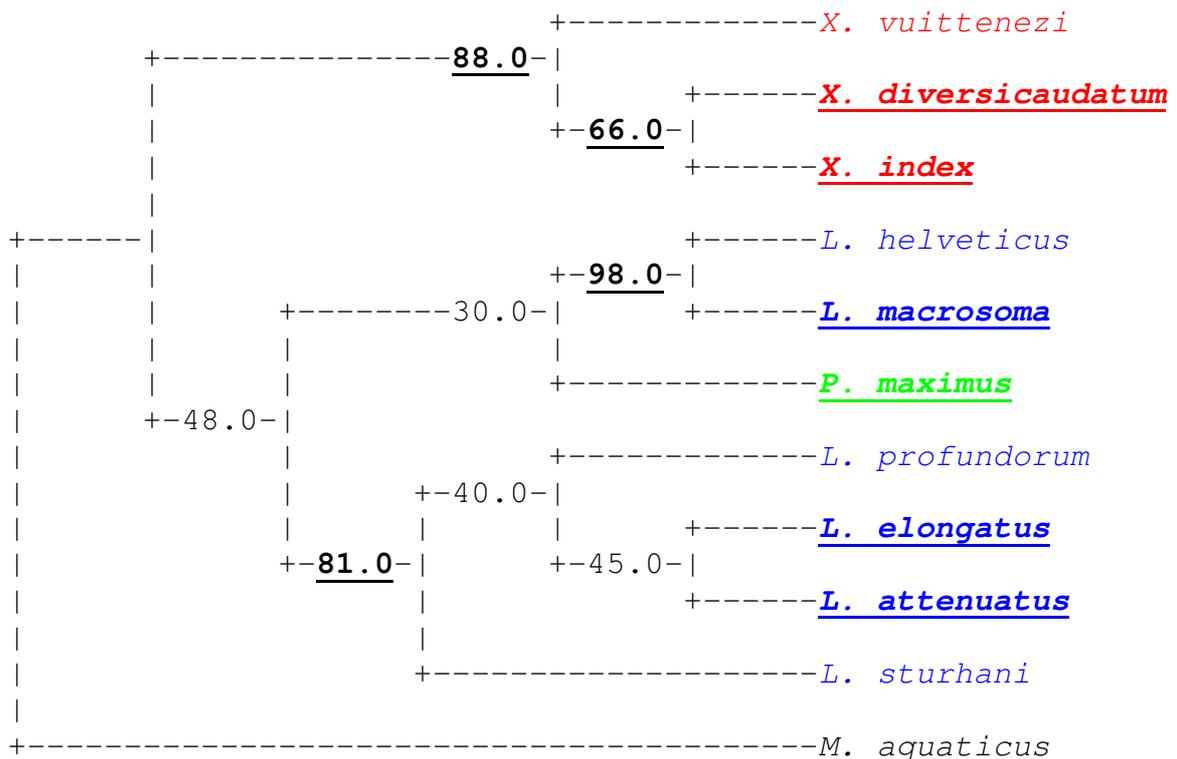


Abb. 3.6: Konsensusstammbaum von zehn in Weinbergserde vorkommenden Longidoridae-Arten mit *Mononchus aquaticus* als „outgroup“. Die angegebenen Zahlen stellen die Bootstrap-Werte dar.

3.1.5.3 Analyse der 42 Longidoridae-Arten

Bei der phylogenetischen Analyse der 42 Longidoridae-Arten ergeben sich zwei statistisch nicht signifikante Hauptgruppen, wovon die eine alle *Longidorus*- und die beiden *Paralongidorus*-Spezies enthält und die andere alle *Xiphinema*-Arten (Abbildung 3.7). Die erstgenannte Großgruppe ist wiederum untergliedert in zwei Gruppierungen, wobei diejenige mit den Arten *L. sturhani*, *L. profundorum*, *L. elongatus* und *L. attenuatus* einen Bootstrap-Wert von über 50 hat, während diejenige mit den Spezies *L. macrosoma*, *L. helveticus* und *P. maximus* nur einen sehr geringen Bootstrap-Wert aufweist. Insgesamt gesehen sind die Beziehungen der Arten innerhalb dieser Großgruppe abgesehen von einigen Zweierpaaren nicht statistisch signifikant geklärt.

Innerhalb der *Xiphinema*-Großgruppe finden sich zwei Unterteilungen, wovon die eine alle zur *X. americanum*-Gruppe gehörenden Arten umfasst und die andere alle übrigen Spezies. Daneben gibt es noch ein paar kleinere Gruppierungen mit Bootstrap-Werten von über 50.

Was die Einordnung der unter 3.1.5.2 untersuchten Arten angeht, so ist sie grob mit der zuvor beobachteten vergleichbar.

Neben den sechs Virusüberträgern im deutschen Weinbau befinden sich noch fünf weitere Vektorarten unter den 42 untersuchten Longidoriden, wobei die einzelnen Spezies über den gesamten Stammbaum verteilt sind. Daraus lässt sich schließen, dass sich diese Eigenschaft im Verlauf der Evolution mehrere Male unabhängig voneinander entwickelt hat.

Ergebnisse

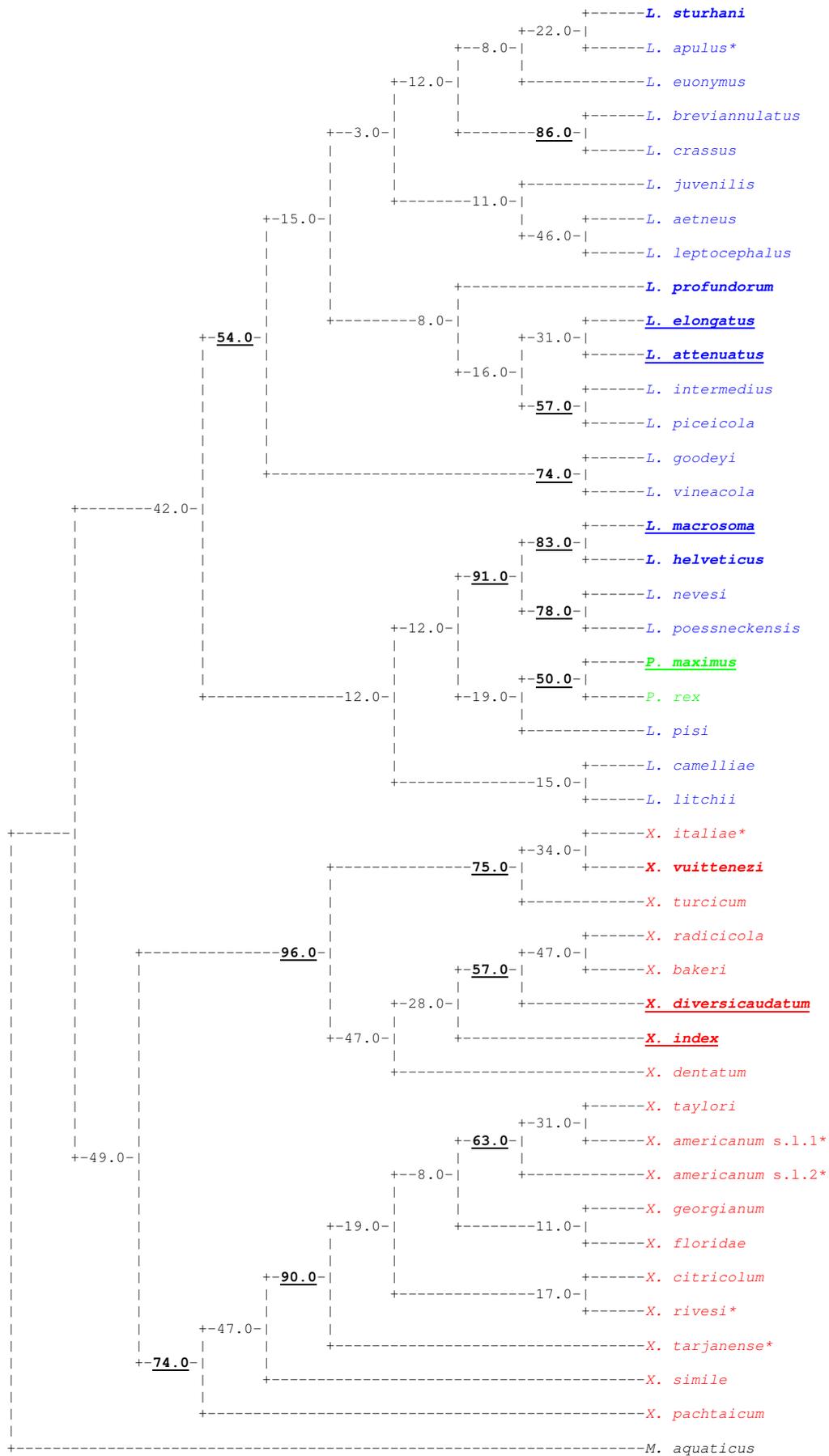


Abb. 3.7: Konsensusstammbaum von insgesamt 42 Longidoridae-Arten mit *Mononchus aquaticus* als „outgroup“. Die im deutschen Weinbau vorkommenden Virusvektoren sind unterstrichen, weitere Überträgerspezies sind mit * gekennzeichnet. Die angegebenen Zahlen stellen die Bootstrap-Werte dar.

3.2 Sequenzierung der ITS1-Region und Primerkonstruktion

3.2.1 Nematoden

Insgesamt wurden 16 Nematodenpopulationen von 7 verschiedenen Arten, darunter vier Virusüberträger im deutschen Weinbau, im Bereich der ITS1-Region sequenziert. Von den sieben Arten gehörten sechs zur Gattung *Longidorus* und eine zur Gattung *Paralongidorus*. Zur Absicherung der Ergebnisse wurden von jeder Art mindestens 2 Einzeltiere untersucht, falls möglich verschiedenen Geschlechtes bzw. unterschiedlicher Entwicklungsstufen.

Frisch extrahierte und in 1 M NaCl aufbewahrte Nematoden konnten gleichermaßen für die beschriebenen Sequenzierungsreaktionen eingesetzt werden.

3.2.2 Zuverlässigkeit der DNA-Extraktion

Die beschriebene Extraktionsmethode erlaubte eine zuverlässige Freisetzung der DNA sowohl bei frischem als auch bei konserviertem Nematoden-Material. Es war allerdings gelegentlich nötig, die NaOH-Lösung zu erneuern, um den Extraktionserfolg zu gewährleisten, insbesondere dann, wenn Ausflockungen zu sehen waren. Aufgrund technischer Probleme konnten gegen Ende der Versuchsarbeiten keine 99 °C mehr mit dem Heizblock erzeugt werden, sondern nur noch etwa 90 °C. Diese Temperaturabsenkung hatte jedoch keinen feststellbaren Einfluss auf das Gelingen der Extraktion.

3.2.3 PCR-Produkte

Die beiden Primer B118 und RN58SR amplifizierten bei allen untersuchten Nematodenherkünften die ITS1-Region. Als PCR-Produkte ergaben sich für die einzelnen Nematodenarten unterschiedlich große Fragmente (Abbildung 3.8 und Tabelle 3.11).

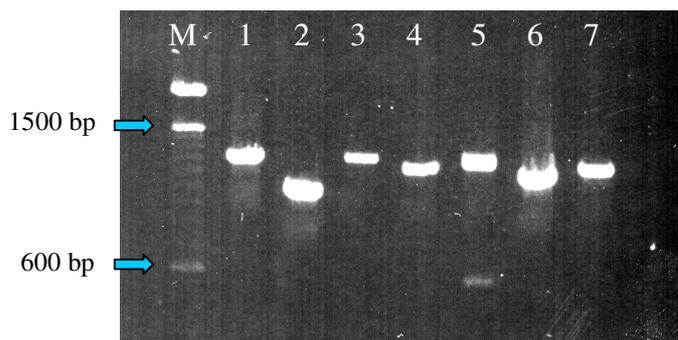


Abb. 3.8: Gelelektrophorese der PCR-Produkte der sieben Nematodenarten mit der Primerkombination B118/RN58SR

M: 100 bp DNA-Marker, Spur 1: *L. attenuatus*, Spur 2: *L. elongatus*, Spur 3: *L. macrosoma*, Spur 4: *P. maximus*, Spur 5: *L. helveticus*, Spur 6: *L. profundorum*, Spur 7: *L. sturhani*

Tab. 3.11: Nematodenarten und Länge der zugehörigen PCR-Produkte bei Verwendung der Primer B118 und RN58SR, bp = Basenpaare

Nematodenart	Länge der PCR-Produkte
<i>L. attenuatus</i>	ca. 1200 bp
<i>L. elongatus</i>	ca. 950 bp
<i>L. macrosoma</i>	ca. 1200 bp
<i>P. maximus</i>	ca. 1100 bp
<i>L. helveticus</i>	ca. 1200 bp
<i>L. profundorum</i>	ca. 1050 bp
<i>L. sturhani</i>	ca. 1150 bp

Bei einigen Individuen der Art *L. attenuatus* und bei allen untersuchten *L. helveticus* zeigten sich in der Gelelektrophorese zusätzlich zu den erwünschten Banden schwache Störbanden (Abbildung 3.8, ca. 500 bp großes Amplifikationsprodukt bei *L. helveticus*). In diesen Fällen musste auf das unter 2.2.2.6 unter Punkt 2 beschriebene DNA-Reinigungsverfahren zurückgegriffen werden, um sicherzustellen, dass nur das erwünschte PCR-Produkt sequenziert wurde.

3.2.4 Sequenzierung

Die vom Sequenzierungslabor ermittelten Basenabfolgen waren je nach Qualität der präzipitierten DNA unterschiedlich lang, meist war es jedoch möglich, die beiden zu einem Nematoden gehörenden Fragmente zusammenzulagern. Es kam in Einzelfällen vor, dass Fragmente so kurz waren, dass keine Überlappung auftrat und somit kein Gesamtkonsensus für jeden einzelnen Nematoden gebildet werden konnte. Diesem Problem wurde jedoch dadurch begegnet, dass pro Nematodenart jeweils mehrere Individuen sequenziert wurden (Abbildung 3.9).

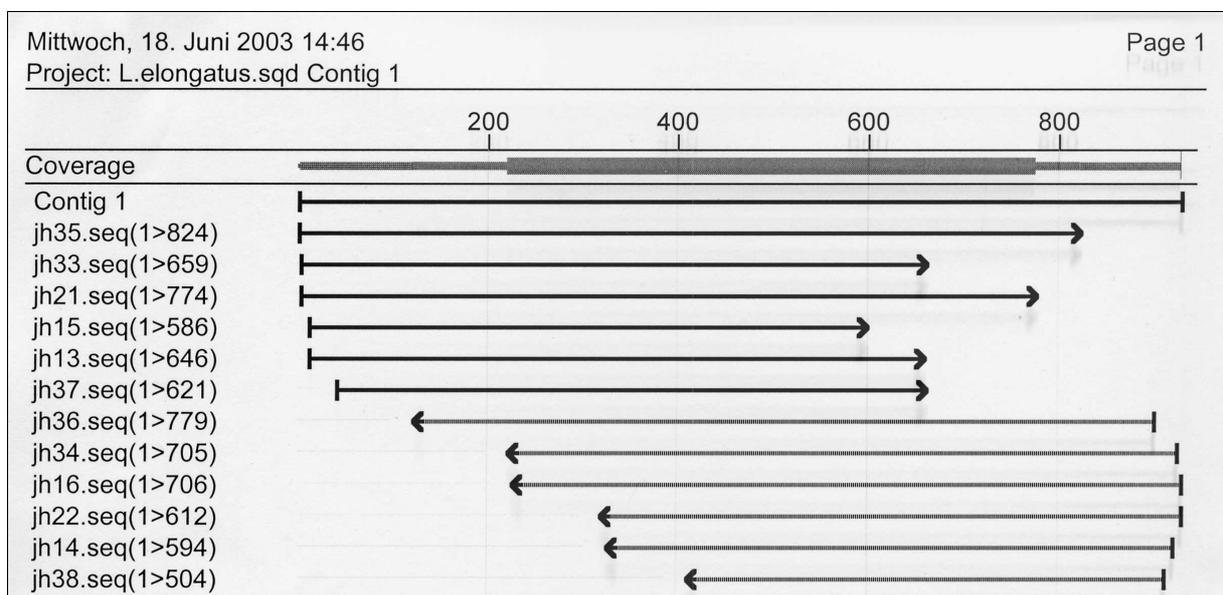


Abb. 3.9: Zusammenlagerung der Sequenzfragmente von insgesamt sechs Einzeltieren mit Hilfe der SeqManII-Anwendung des Lasergene-Programmpaketes zu einem Gesamtkonsensus am Beispiel von *Longidorus elongatus*.

3.2.5 Sequenzdatenanalyse

a) Variation innerhalb von Populationen

Mit einer einzigen Ausnahme (*L. elongatus*, Heppenheim) wurden pro Population jeweils mehrere Individuen - falls möglich unterschiedlichen Geschlechtes bzw. Entwicklungsstadiums - sequenziert. Zwischen diesen Einzeltieren traten keine Sequenzunterschiede auf, abgesehen von der unten erwähnten Population von *L. helveticus* aus der Schweiz.

b) Variation zwischen Populationen einer Art

Von allen untersuchten Arten wurden mindestens zwei Populationen sequenziert und bei *L. macrosoma*, *P. maximus* und *L. profundorum* traten keinerlei Unterschiede zwischen den Herkünften auf. Nur jeweils ein Unterschied wurde bei *L. elongatus* und bei *L. sturhani* festgestellt. *L. attenuatus* wies an insgesamt 12 Positionen Differenzen zwischen den Populationen auf, wobei jedoch erwähnt werden muss, dass bei dieser Art an mehreren Stellen die Sequenzchromatogramm-Peaks nicht eindeutig waren. Bei *L. helveticus* wurden 27 Unterschiede gefunden, wobei zusätzlich dazu zwei der drei Individuen aus der Schweizer Population eine 60 bp umfassende Deletion aufwiesen. Dennoch gelang es in jedem der Fälle eine Konsensussequenz zu bilden, wobei die Länge derselben von Art zu Art unterschiedlich ist und im Bereich von etwa 930 bis rund 1200 bp rangiert.

c) Variation zwischen den Arten

Neben den Längenunterschieden traten zwischen den Spezies auch erhebliche Sequenzdaten-differenzen in der gesamten ITS1-Region auf, was eine Aneinanderlagerung der Konsensussequenzen sehr erschwerte. Eine Gegenüberstellung der einzelnen Arten wie bei der Analyse der 18S-Daten erwies sich als nicht realisierbar. Auch war es trotz Vergleich mit den Sequenzdaten der drei *Xiphinema*-Arten *X. diversicaudatum*, *X. index* und *X. vuittenezi* (EMBL Datenbank) nicht möglich, die Länge der ITS1-Region für die sieben Arten zu ermitteln, da die Sequenzen entweder zu kurz oder der Beginn des 5.8S-Genes nicht zu erkennen waren. Zusammen mit den 18S-Daten beläuft sich die zur Verfügung stehende Sequenzinformation pro Art auf über 2500 bp (Tabelle 3.12), wobei die ITS1-Daten für die drei *Xiphinema*-Spezies aus der EMBL Datenbank (AJ437026, AJ437027, AJ437028) stammen.

Tab. 3.12: Gesamtlänge der ermittelten Sequenzdaten für die 10 Longidoridae-Arten

Nematodenart	Gesamtlänge der Sequenz (18S-Gen + ITS1-Region)
<i>L. attenuatus</i>	2796 bp
<i>L. elongatus</i>	2561 bp
<i>L. macrosoma</i>	2778 bp
<i>P. maximus</i>	2693 bp
<i>L. helveticus</i>	2831 bp
<i>L. profundorum</i>	2642 bp
<i>L. sturhani</i>	2727 bp
<i>X. diversicaudatum</i>	2748 bp
<i>X. index</i>	2726 bp
<i>X. vuittenezi</i>	2705 bp

3.2.6 Primerkonstruktion

Aufgrund der vielfältigen Differenzen in den Nukleotidabfolgen zwischen den einzelnen Nematodenarten fanden sich für jede Spezies mehrere potentielle Bereiche zur Primerkonstruktion. Die Anzahl wurde jedoch wesentlich dadurch eingeschränkt, dass die neu zu entwickelnden Primer mit dem universellen Vorwärtsprimer B118 kompatibel sein sollten.

Von den möglichen Primersequenzen wurden insgesamt 19 praktischen Tests unterworfen, eine wesentlich größere Anzahl erwies sich bereits bei den mit dem Programm Lasergene gemachten Vorüberprüfungen als nicht geeignet. Die 8 schließlich ausgewählten Primer, darunter sieben artspezifische Rückwärts- und ein allgemeiner Vorwärtsprimer, sind in Tabelle 3.13 aufgelistet.

Tab. 3.13: Spezifische Primer zum Nachweis von Virusvektoren im deutschen Weinbau und verwandten Nematodenarten

Primer	Länge	Sequenzen in 5´-3´-Richtung	Amplifikationsrichtung
Latten3	30 bp	TTC CCT TTT CCC TGA TTA TAA TTT TCT ATC	rückwärts
Lelong1	23 bp	TTA TCG TAC GTA TTC CCA GTT CT	rückwärts
Lmacro2	21 bp	GTT CCC GAC GAT TAT TTT TGT	rückwärts
Pmax1	22 bp	TGC ATT TCA CCA CTT CTC ACT C	rückwärts
Lhel1	29 bp	CCG CAT CTC TTT ATT TCC GAC CAT CAA CC	rückwärts
Lprof2	28 bp	TTA TTA TTT TTC AGG CTC TAC CTT TCG C	rückwärts
Lstur	25 bp	TTT TCC CCA CTA ATA CTC CCT CGT T	rückwärts
GenF	23 bp	TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT GT	vorwärts

3.3 Primertestungen

3.3.1 Testung der von WANG *et al.* (2003) entwickelten *Xiphinema*-Primer

3.3.1.1 Nachweissicherheit

Alle getesteten Herkünfte der drei *Xiphinema*-Arten konnten zuverlässig mit den von WANG *et al.* (2003) entwickelten Primern nachgewiesen werden. Es ergaben sich jeweils Banden der erwarteten Größe in der Gelelektrophorese (Abbildung 3.10).

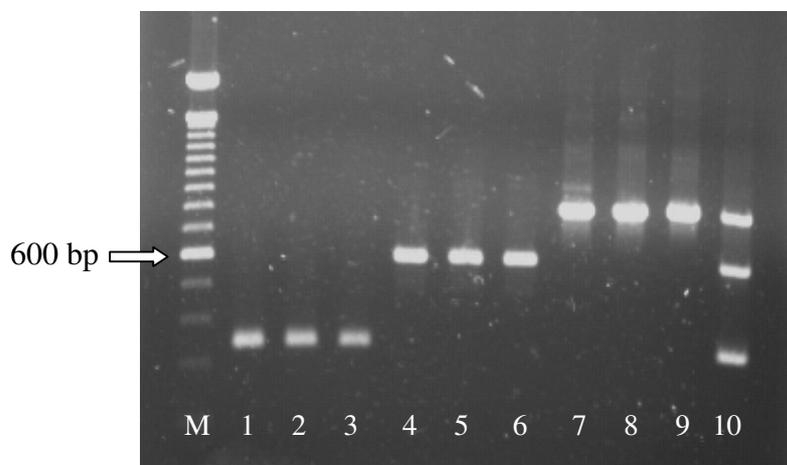


Abb. 3.10: Beispiel für eine Gelelektrophorese mit den spezifischen Primern für *X. index*, *X. vuittenezi* und *X. diversicaudatum*. M= 100 bp DNA-Marker
Spuren 1-3: *X. index* (Nierstein, Klotten, Bissersheim), Spuren 4-6: *X. vuittenezi* (Westhofen, Haardt, Bad Kreuznach), Spuren 7-9: *X. diversicaudatum* (Schweigen-Rechtenbach, Hambach, Piesport), Spur 10: *X. index* + *X. vuittenezi* + *X. diversicaudatum*

3.3.1.2 Spezifität

Zur Überprüfung der Spezifität der Primer wurde DNA von den in Tabelle 2.13 aufgeführten Longidoridae-Arten eingesetzt. Dabei ergaben sich keinerlei Amplifikationsprodukte mit einer Ausnahme: *L. elongatus*-DNA kombiniert mit dem Primer für *X. index* resultierte manchmal in einer schwachen Bande von etwa 500 bp in der Gelelektrophorese (Abbildung 3.11). Wenn Nematodenmischungen aus Nicht-Longidoriden für die Untersuchungen eingesetzt wurden, zeigten sich keine Störbanden.

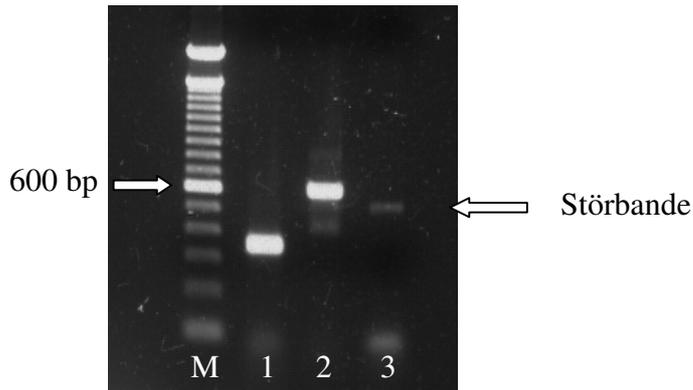


Abb. 3.11: Gelelektrophorese von *X. index* und *X. vuittenezi* mit artspezifischen Primern (Spuren 1 und 2) und *L. elongatus*-DNA mit dem Primerpaar für *X. index* (Spur 3). M= 100 bp DNA-Marker

3.3.1.3 Sensitivität

Bei den in Tabelle 2.14 genannten DNA-Mischungen gelang es bis zu einer Verdünnung von 1:1:800 den bzw. die Virusüberträger eindeutig unter dem Nichtüberträger *X. vuittenezi* nachzuweisen. Erst bei 1:1:1000 war die *X. diversicaudatum*-Bande höchstens noch andeutungsweise zu sehen und die *X. index*-Bande war relativ schwach (Abbildung 3.12).

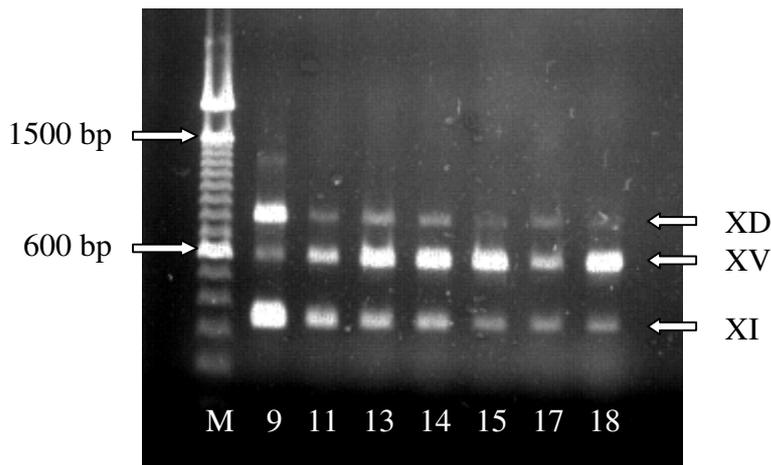


Abb. 3.12: Gelelektrophorese der DNA-Mischungen 9, 11, 13, 14, 15, 17 und 18 aus Tabelle 2.14 mit jeweils allen drei *Xiphinema*-Primern. M = 100 bp DNA-Marker, XD: *X. diversicaudatum*, XI: *X. index*, XV: *X. vuittenezi*

Die gemeinsame DNA-Extraktion mehrerer Nematoden erwies sich ebenfalls als erfolgreich und mit dieser Methode war es möglich, ein einzelnes Tier von *X. index* bzw. *X. diversicaudatum* unter 200 *X. vuittenezi* nachzuweisen (Abbildung 3.13). Da die Banden relativ stark waren, scheint die Nachweisgrenze noch höher zu liegen. Für die in der Praxis vorkommenden Nematodenzahlen pro 100 Kubikzentimeter ausgewaschenem Boden ist die Sensitivität des Nachweises auf jeden Fall ausreichend hoch.

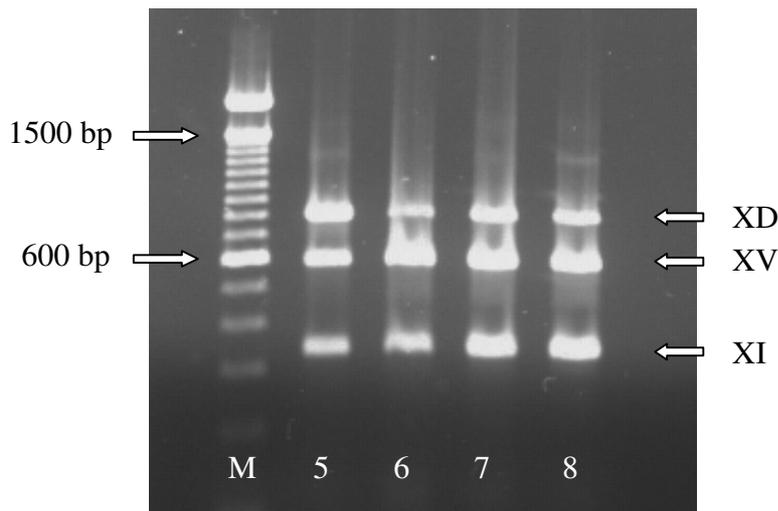


Abb. 3.13: Elektrophorese der Proben 5-8 aus Tabelle 2.15 mit jeweils allen drei *Xiphinema*-Primern.

M = 100 bp DNA-Marker, XD: *X. diversicaudatum*, XI: *X. index*, XV: *X. vuittenezi*

Bei den Versuchen zum Nachweis der beiden virusübertragenden *Xiphinema*-Arten unter ganzen Nematodengemeinschaften aus Weinbergsböden zeigte sich, dass die übrigen Arten scheinbar keinen negativen Einfluss auf die Detektion haben (Abbildung 3.14).

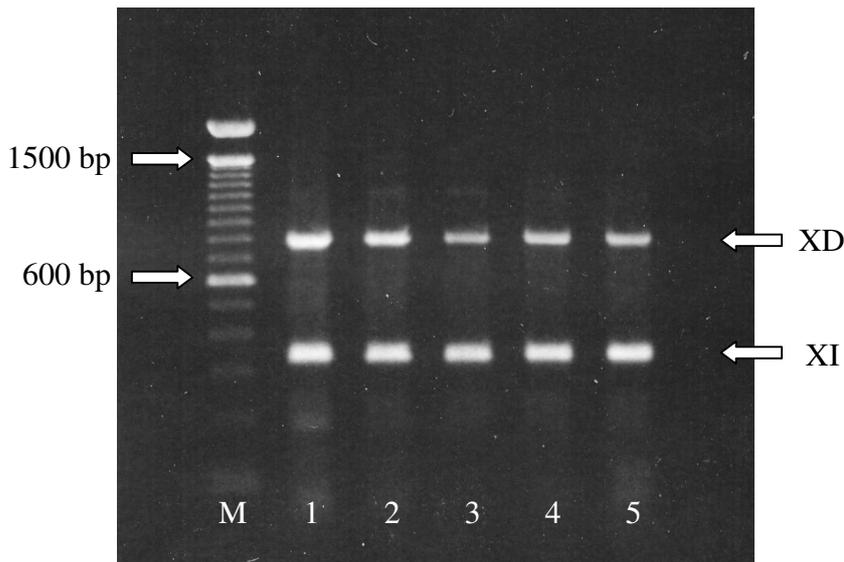


Abb. 3.14: Elektrophorese der PCR-Produkte zum Nachweis von *X. index* und *X. diversicaudatum* unter ganzen Nematodengemeinschaften mit Hilfe von artspezifischen Primern.

Spur 1: Nematodengemeinschaft Herxheim a + 1XI + 1XD; Spur 2: Nematodengemeinschaft Herxheim b + 1XI + 1XD; Spur 3: extrahierte DNA der Gemeinschaft Deidesheim + extrahierte DNA von XI und XD; Spuren 4 und 5: zwei identische Nematodenmischungen aus einem Weinberg in Bad Dürkheim + extrahierte DNA von XI und XD.

M = 100 bp DNA-Marker, XD: *X. diversicaudatum*, XI: *X. index*.

3.3.2 Testung der *Longidorus*- und *Paralongidorus*-Primer

3.3.2.1 Nachweissicherheit, Spezifität und Sensitivität

Bei allen Primern, die den praktischen Testungen unterworfen worden waren, konnten mit der zur Sequenzierung verwendeten DNA Fragmente erwarteter Länge beobachtet werden. Einige der Primer erzeugten jedoch auch mit artfremder DNA Amplifikate, insbesondere wenn der allgemeine Vorwärtsprimer B118 eingesetzt wurde. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe der 18S-Sequenzdaten der spezifischer arbeitende Vorwärtsprimer GenF entwickelt. Dieser Primer produzierte mit den in Tabelle 3.13 angegebenen Rückwärtsprimern bei Zugabe artspezifischer DNA Fragmente unterschiedlicher Größe (Abbildung 3.15 und Tabelle 3.14).

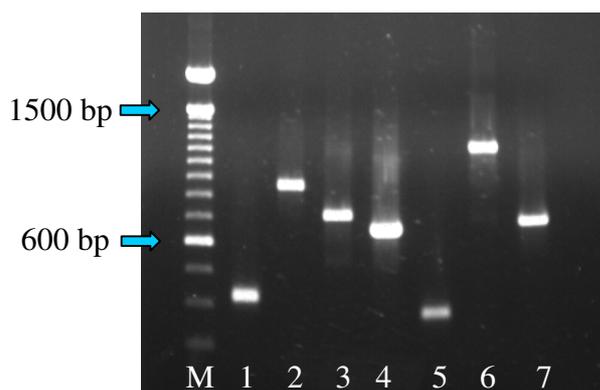


Abb. 3.15: Elektrophorese der Amplifikationsprodukte von DNA von sieben verschiedenen Longidoridae-Arten mit den Primern aus Tabelle 3.13. M = 100 bp DNA-Marker. Spur 1: *L. attenuatus* mit GenF/Latten3, Spur 2: *L. elongatus* mit GenF/Lelong1, Spur 3: *L. macrosoma* mit GenF/Lmacro2, Spur 4: *P. maximus* mit GenF/Pmax1, Spur 5: *L. helveticus* mit GenF/Lhel1, Spur 6: *L. profundorum* mit GenF/Lprof2, Spur 7: *L. sturhani* mit GenF/Lstur

Tab. 3.14: Spezifische Fragmentgrößen bei Verwendung der neu entwickelten Primer

Primerpaar	Fragmentlänge
GenF / Latten3	419 bp
GenF / Lelong1	847 bp
GenF / Lmacro2	705 bp
GenF / Pmax1	649 bp
GenF / Lhel1	369 bp
GenF / Lprof2	1071 bp
GenF / Lstur	667 bp

Bei keiner der Primerkombinationen aus Tabelle 3.14 traten mit artfremder DNA PCR-Produkte auf, auch dann nicht, wenn die beiden Nematodengemeinschaften aus Weinbergsböden verwendet wurden. Die Primer erwiesen sich von daher als spezifisch für die jeweiligen Arten.

Bei den Versuchen zum Nachweis von Virusüberträgern innerhalb von Nematodengemeinschaften stellte sich heraus, dass sowohl bei einer gemeinsamen DNA-Extraktion als auch bei Mischungen von zuvor extrahierter DNA eine Detektion möglich war (Abbildung 3.16). Ein Multiplex-Einsatz von Latten3 mit Lmacro2 und Lelong1 mit Pmax1 erwies sich ebenfalls als erfolgreich. Beim gleichzeitigen Einsatz aller vier spezifischen Rückwärtsprimer ergaben sich jedoch nicht für alle Arten spezifische Fragmente, insbesondere *L. attenuatus*-Banden waren in keinem der Fälle sichtbar (Abbildung 3.16, Spuren 7 und 14).

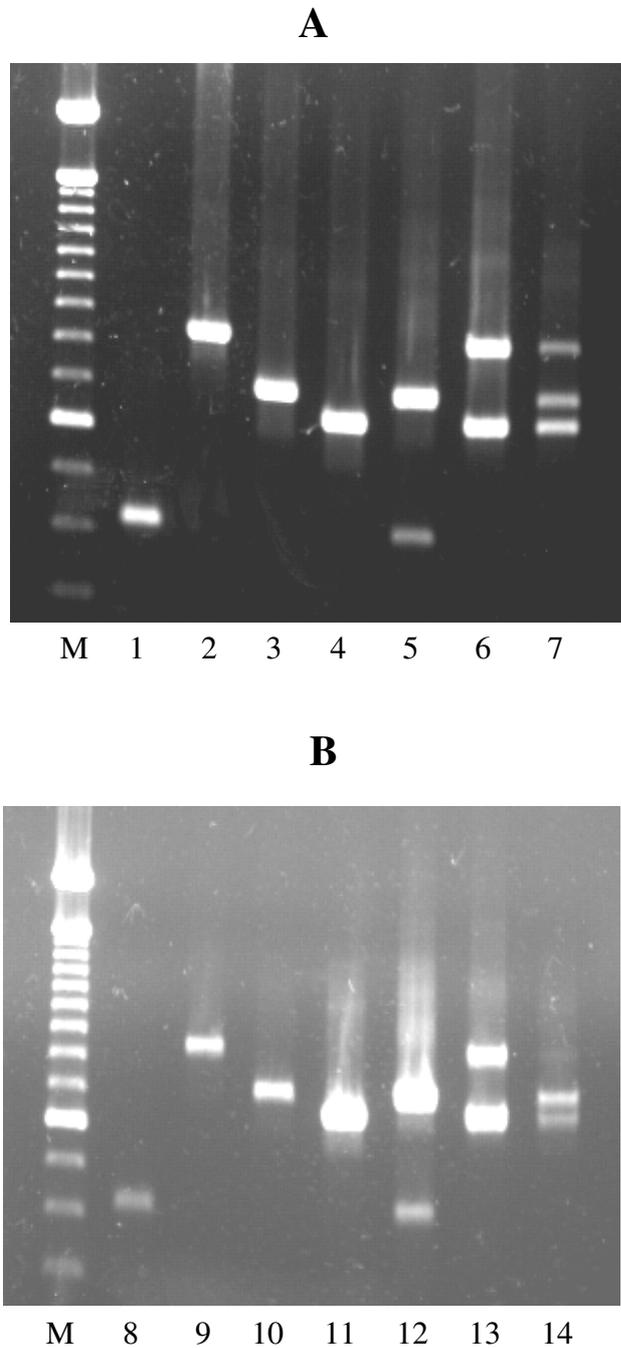


Abb. 3.16: Nachweis von virusübertragenden Longidoriden unter gesamten Nematodengemeinschaften. M = 100 bp DNA-Marker. **A:** Nematodengemeinschaft Biebelnheim + je ein Individuum von *L. attenuatus*, *L. elongatus*, *L. macrosoma* und *P. maximus*, gemeinsame DNA-Extraktion, **B:** Nematodengemeinschaft Westhofen + DNA von *L. attenuatus*, *L. elongatus*, *L. macrosoma* und *P. maximus*. Spuren 1 und 8: GenF/Latten3, Spuren 2 und 9: GenF/Lelong1, Spuren 3 und 10: GenF/Lmacro2, Spuren 4 und 11: GenF/Pmax1, Spuren 5 und 12: GenF/Latten3 + Lmacro2, Spuren 6 und 13: GenF/Lelong1 + Pmax1, Spuren 7 und 14: GenF/Latten3 + Lelong1 + Lmacro2 + Pmax1

Um die Verlässlichkeit der Nachweismethode zu überprüfen, wurden die Primer mit unterschiedlichen Nematodenherkünften getestet. Wie bereits erwähnt, zeigten die Sequenzierungen bei manchen Arten Unterschiede zwischen einzelnen Populationen. Treten diese Variationen nun in einem Bereich auf, der zur Primerkonstruktion verwendet wurde, ist es möglich, dass der entsprechende Primer nicht mehr richtig anlagern und deshalb nicht zuverlässig arbeiten kann. Aus diesem Grund wurden die bei der Sequenzdatenanalyse beobachteten variablen Bereiche nicht zur Primerkonstruktion verwendet. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass bei weiteren Populationen zusätzliche Regionen mit Variationen festgestellt werden könnten. Deshalb wurden die Primer jeweils mit allen verfügbaren Herkünften der einzelnen Arten überprüft (Abbildung 3.17).

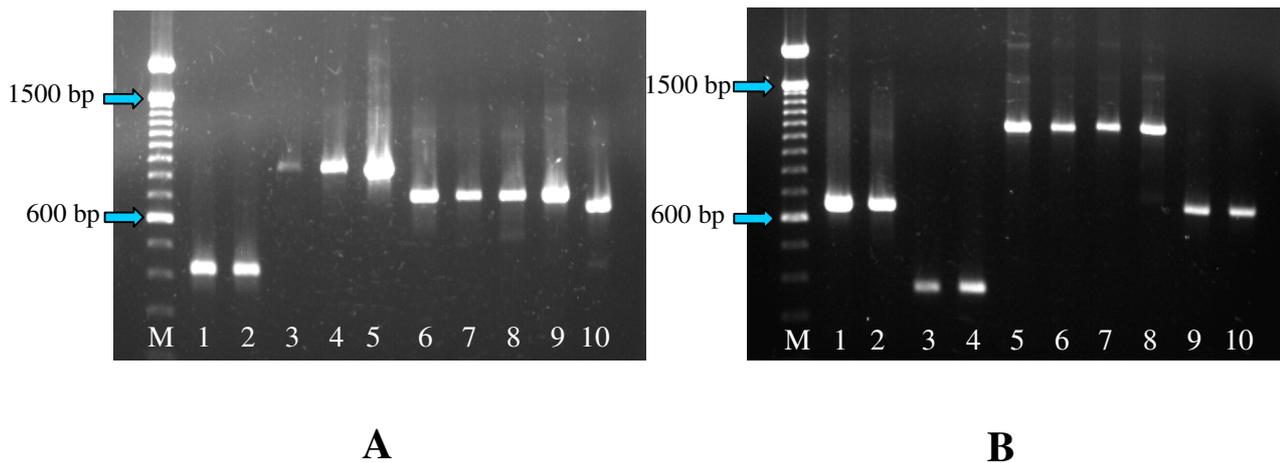


Abb. 3.17: Nachweis verschiedener Populationen einer Art mit Hilfe der Primerkombinationen aus Tabelle 3.14. M = 100 bp DNA Marker. **A:** Spuren 1 und 2: *L. attenuatus* (Gau Algesheim, Larve; Mettenheim, Larve) mit GenF/Latten3, Spuren 3-5: *L. elongatus* (Heppenheim, Weibchen; Bad Dürkheim, Weibchen; Niederlande, Larve) mit GenF/Lelong1, Spuren 6-9: *L. macrosoma* (Heppenheim, Weibchen; Landau, Larve; Freiburg, Männchen; Herxheim, Larve) mit GenF/Lmacro2, Spur 10: *P. maximus* (Mußbach, Larve) mit GenF/Pmax1. **B:** Spuren 1 und 2: *P. maximus* (Kallstadt, Weibchen; Deidesheim, Larve) mit GenF/Pmax1, Spuren 3 und 4: *L. helveticus* (Horrweiler, Larve; Roche d'Or, Weibchen) mit GenF/Lhel1, Spuren 5-8: *L. profundorum* (Horrweiler, Weibchen; Gau Algesheim, Larve; Landau, Weibchen; Schimsheim, Männchen) mit GenF/Lprof2, Spuren 9 und 10: *L. sturhani* (Gau Algesheim, Weibchen; Ockenheim, Larve) mit GenF/Lstur

Die Abbildung 3.17 zeigt außerdem, dass es möglich ist, alle Entwicklungsstufen und beide Geschlechter der Nematoden nachzuweisen. Damit ist gewährleistet, dass eine Identifikation auch bei Larvenstadien durchgeführt werden kann, da die extrahierte DNA einer einzigen Larve für den Nachweis ausreicht.

3.3.2.2 Anpassung der PCR-Bedingungen und Möglichkeiten des Multiplexing

Bei der Verwendung des Vorwärtsprimers B118 ergaben sich in Kombination mit manchen der neu konstruierten Rückwärtsprimer auch dann Banden, wenn artfremde DNA eingesetzt wurde. Um die Bildung dieser unspezifischen Amplifikate zu verhindern, wurden die PCR-Bedingungen dahingehend variiert, dass sowohl die Anlagerungstemperatur der Primer stufenweise erhöht als auch die Zyklenzahl reduziert wurde. Trotzdem gelang es nicht, alle Störbanden zu unterdrücken, insbesondere, da nicht alle Primer bei deutlich höheren Anlagerungstemperaturen zuverlässig arbeiteten. Durch den Einsatz von GenF war es möglich, das genau gleiche PCR-Programm wie für die *Xiphinema*-Primer zu verwenden, was wiederum eine Untersuchung von Proben auf alle sechs Virusüberträger im deutschen Weinbau und weitere vier Longidoridae-Arten gleichzeitig in einem PCR-Lauf erlaubt.

Um nicht nur alle Primer bei den gleichen PCR-Bedingungen einsetzen zu können, sondern auch die morphologisch ähnlichen Arten bzw. einzelne Vektorarten in einem einzigen PCR-Ansatz nachweisen zu können, wurde bereits bei der Konstruktion der Primer auf Möglichkeiten des Multiplexing geachtet. Die praktische Erprobung ergab, dass alle Primer für die Virusüberträger jeweils in Zweierpaaren einsetzbar waren, wobei allerdings die Fragmentgrößenunterschiede zwischen *L. macrosoma* und *P. maximus* sehr gering sind und eine Kombination der entsprechenden Primer von daher nicht empfehlenswert ist (Abbildung 3.18, Spur 7). Daneben erwies es sich als möglich, die morphologisch ähnlichen Arten *L. elongatus* und *L. sturhani*, sowie die Arten *L. macrosoma*, *L. helveticus* und *L. profundorum* gleichzeitig in einem PCR-Ansatz nachzuweisen (Abbildung 3.18).

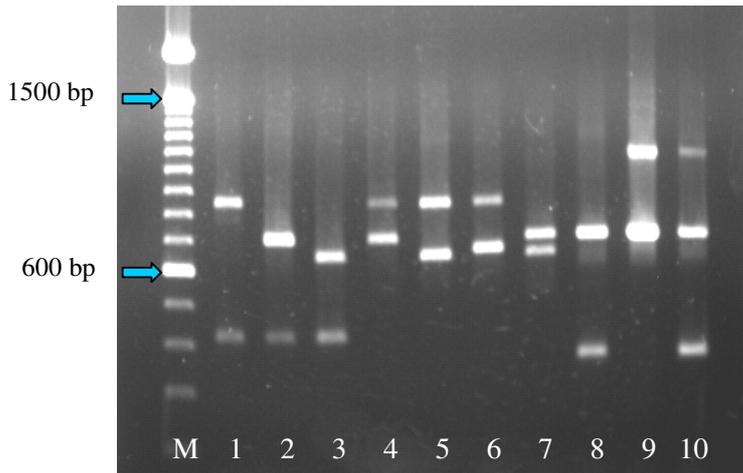


Abb. 3.18: Möglichkeiten des Multiplexing mit den Primern aus Tabelle 3.13. M = 100 bp DNA-Marker. Spur 1: *L. attenuatus* + *L. elongatus* mit GenF/Latten3 + Lelong1, Spur 2: *L. attenuatus* + *L. macrosoma* mit GenF/Latten3 + Lmacro2, Spur 3: *L. attenuatus* + *P. maximus* mit GenF/Latten3 + Pmax1, Spur 4: *L. elongatus* + *L. macrosoma* mit GenF/Lelong1 + Lmacro2, Spur 5: *L. elongatus* + *P. maximus* mit GenF/Lelong1 + Pmax1, Spur 6: *L. elongatus* + *L. sturhani* mit GenF/Lelong1 + Lstur, Spur 7: *L. macrosoma* + *P. maximus* mit GenF/Lmacro2 + Pmax1, Spur 8: *L. macrosoma* + *L. helveticus* mit GenF/Lmacro2 + Lhel1, Spur 9: *L. macrosoma* + *L. profundorum* mit GenF/Lmacro2 + Lprof2, Spur 10: *L. macrosoma* + *L. helveticus* + *L. profundorum* mit GenF/Lmacro2 + Lhel1 + Lprof2

3.3.3 Praxiseinsatz

Bei den Versuchen zum Einsatz von hitzefixierten Nematoden stellte sich heraus, dass diese Behandlung die darauffolgenden Arbeitsschritte nicht negativ beeinflusst. Von der Stärke der Banden in der Gelelektrophorese her gesehen, konnten keine Unterschiede zwischen vor Beginn der DNA-Extraktion noch lebenden, hitzefixierten und in 1 M NaCl konservierten Individuen beobachtet werden. Damit ist es möglich, Nematoden zuerst morphologisch zu untersuchen und hinterher zur Überprüfung des Ergebnisses die selben Tiere in der PCR einzusetzen bzw. Proben aufzubewahren und zu einem späteren Zeitpunkt weiterzuverarbeiten.

Die neu entwickelten Primer wurden ebenso wie die *Xiphinema*-Primer zur Bestimmung von in der Praxis gefundenen Larven bzw. zur Nachbestimmung von adulten Tieren eingesetzt und erwiesen sich auch hierbei als zuverlässig. Bislang wurden auf diese Weise rund 70 Praxisproben untersucht, wobei die meisten davon *Xiphinema*-Larven enthielten. Dadurch, dass mehrere Primer gemeinsam eingesetzt werden können, ist nicht nur der direkte Nachweis einzelner Arten innerhalb von Mischpopulationen möglich, sondern auch eine effiziente und kostengünstige Probenuntersuchung.

4. Diskussion

4.1 Methodik

Um zuverlässige Ergebnisse zu erzielen und der Gefahr von Fehlentscheidungen vorzubeugen, muss das verwendete Diagnoseverfahren möglichst störungsfrei arbeiten. Wenn beispielsweise das Fehlen einer Bande in der Gelelektrophorese interpretiert wird als das Nichtvorhandensein der entsprechenden Art in der Probe, so sollte mit einer hohen Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden können, dass das negative Ergebnis auf Unzulänglichkeiten der verwendeten Methodik zurückzuführen ist. Aus diesem Grunde sind für die einzelnen Schritte des hier beschriebenen Verfahrens einige Punkte zu berücksichtigen.

4.1.1 DNA-Extraktion

Die beschriebene Extraktionsmethode erlaubte in der Regel eine zuverlässige Freisetzung der DNA. In manchen Fällen jedoch gelang sie nur sehr unzureichend. Dabei war ein Zusammenhang mit dem Alter der 0,25 M NaOH-Lösung festzustellen. Im Gegensatz zu den anderen drei Chemikalien musste sie gelegentlich erneuert werden und zwar immer dann, wenn flockige Ausfällungen zu sehen waren. Wurde dies nicht beachtet, so kam es oft zu einer nicht ordnungsgemäßen Lyse des Nematoden und damit zu einer nur unvollständigen Freisetzung der DNA. In diesen Fällen wurden meist auch nur schwache Banden in der Gelelektrophorese beobachtet. Im Gegensatz dazu schien eine etwas geringere Temperatur von rund 90 °C anstatt der geforderten 99 °C das Gelingen der Extraktion nicht wesentlich zu beeinträchtigen.

Im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen aufwändigen Extraktions-Verfahren, bei denen die Nematoden z.B. erst gewaschen (BEKAL *et al.*, 1997; GASSER *et al.*, 1997; HOYER *et al.*, 1998; MOLINARI *et al.*, 1997; ZIJLSTRA *et al.*, 1995, 1997) und/oder zerschnitten (FERRIS *et al.*, 1993; WAEYENBERGE *et al.*, 2000) oder zerdrückt (BEKAL *et al.*, 1997; BLOK *et al.*, 1998; FLEMING *et al.*, 1998; MITKOWSKI *et al.*, 2002; NGUYEN *et al.*, 2001; UEHARA *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 2003; ZIJLSTRA *et al.*, 1995, 1997) werden müssen, ist das hier vorgestellte Verfahren sehr einfach zu handhaben und von einem einzigen Nematoden kann DNA für rund 80 PCR-Reaktionen gewonnen werden.

4.1.2 PCR und Gelelektrophorese

Ebenso wie das DNA-Extraktionsverfahren, stellten sich PCR und Gelelektrophorese in der Regel als zuverlässig heraus. Bei der PCR-Methode erwies sich insbesondere die sehr einfache Handhabung dank der verwendeten PCR-Beads als Vorteil. Zu beachten war jedoch, dass bei der DNA bzw. den Primern die Qualität bei zu häufigem Auftauen und Wiedereinfrieren nachließ. Auch dieser Umstand spiegelte sich in schwachen Banden in der Elektrophorese wider. Für die Primer wurde deshalb eine gewisse Menge an Arbeitslösung angesetzt und diese auf mehrere Eppendorf-Gefäße verteilt. Beim Ansetzen des PCR-Mixes erwies es sich als vorteilhaft, DNA und Primer vor der Verwendung gut zu mischen. Dadurch konnten zusammen mit dem Mischen des PCR-Produktes vor dem Auftragen auf das Gel stärkere Banden erzielt werden bzw. manchmal überhaupt erst sichtbar gemacht werden.

Bei der Gelelektrophorese selbst war es immer dann nötig, den verwendeten TBE-Puffer in der Elektrophorese-Kammer zu erneuern, wenn die Banden, insbesondere auch die des DNA-Markers, schwach bzw. wie verschmiert aussahen. Zu beachten war weiterhin, dass bei längeren Gel-Laufzeiten die kleineren PCR-Produkte (wie sie z.B. beim Nachweis von *X. index*, *L. attenuatus* oder *L. helveticus* gebildet werden) oft nicht mehr deutlich zu sehen waren. Das hängt damit zusammen, dass das Ethidiumbromid genau in die entgegengesetzte Richtung wandert wie die DNA-Fragmente. Wenn also längere Gel-Laufzeiten nötig sind, um eine bessere Auftrennung zwischen ähnlich großen PCR-Produkten zu erreichen, wäre es möglicherweise von Vorteil, die Färbung des Geles erst nach der Elektrophorese in einer Ethidiumbromid-Lösung vorzunehmen.

4.2 Sequenzierung des 18S-Genes

4.2.1 Sequenzdatenanalyse allgemein

Zwischen den 8 untersuchten Populationen von *Xiphinema diversicaudatum* kamen ebenso wie zwischen den 11 Herkünften von *X. index* bzw. den 4 *Xiphinema vuittenezi*-Populationen keine Sequenzunterschiede vor, eine Beobachtung, die auch DE LEY *et al.* (2002) bei zwei Isolaten von *Meloidogyne hapla* machten. Demgegenüber fanden NEILSON *et al.* (2004) und OLIVEIRA *et al.* (2004) bei manchen der von ihnen untersuchten Longidoridae-Arten eine geringe intraspezifische Variation im 18S-Gen, wobei die Autoren jedoch vermuten, dass diese durch PCR-Artefakte bzw. Sequenzierfehler bedingt ist.

Bei den interspezifischen Unterschieden überwogen in vorliegender Arbeit deutlich die Basensubstitutionen, obwohl bei manchen der Arten zusätzlich dazu Insertionen bzw. Deletionen und gelegentlich inversionsähnliche Änderungen vorliegen. Von „inversionsähnlich“ wird deshalb gesprochen, weil grundsätzlich auch einzelne Punktmutationen an aufeinanderfolgenden Positionen zufällig das Muster einer Inversion zeigen können. NEILSON *et al.* (2004) fanden in Übereinstimmung mit den hier vorgestellten Untersuchungen bei den von ihnen verglichenen Longidoriden hauptsächlich Punktmutationen und nur wenige Insertionen bzw. Deletionen. Das wiederum resultiert in vergleichsweise geringen Längenunterschieden in der 18S-Genregion, von denen auch bei anderen Nematodenarten berichtet wird (ALESHIN *et al.*, 1998; BOUTSIKA, 2002; DE LEY *et al.*, 2002), während GIRIBET und RIBERA (2000) bei Arthropoden zum Teil erhebliche Schwankungen (zwischen 1350 und 2700 bp) fanden. In der vorliegenden Arbeit variierte die Sequenzlänge bei gleichem Anfangs- und Endpunkt zwischen 1746 und 1753 bp, Werte also, die ziemlich genau mit den 18S-Längenangaben für *C. elegans* übereinstimmen (FILES und HIRSH, 1981; ELLIS *et al.*, 1986). Das 18S-Gen weist neben hochkonservierten Regionen auch etwas variablere Bereiche auf, eine Beobachtung, die auch von DOVER (1988) und DORRIS *et al.* (1999) bestätigt wird. In vorliegender Arbeit waren 87,85 % aller Basen bei den 42 Longidoriden identisch. OLIVEIRA *et al.* (2004) fanden bei den von ihnen untersuchten 21 Longidoridae-Herkünften eine geringere Homologie von 79,5 %, obwohl alle Populationen aus Brasilien stammen und nur zwei verschiedenen Gattungen angehören.

4.2.2 Sequenzdatenanalyse der Virusüberträger im deutschen Weinbau und verwandter Arten

Obwohl die Virusüberträger drei verschiedenen Gattungen angehören, waren 93,55 % aller Nukleotide identisch zwischen ihnen. Innerhalb der Gattungen war die Identität noch größer und betrug mehr als 97 % bei den drei *Longidorus*-Arten und sogar rund 99 % bei den beiden *Xiphinema*-Spezies. *Paralongidorus maximus* war mit rund 97 % Sequenzidentität der Gattung *Longidorus* näher als *Xiphinema* mit rund 95 %. Von den Unterschieden her gesehen, kommen hauptsächlich Basensubstitutionen vor und zwar überwiegend Transitionen. Daneben scheinen ein paar Inversionen vorzuliegen, wobei es sich grundsätzlich auch um zwei Substitutionen an aufeinanderfolgenden Positionen handeln könnte, die zufällig das Muster einer Inversion zeigen. Im Vergleich zu den *Xiphinema*-Arten kommen bei den übrigen vier Vektoren Deletionen vor.

BOUTSIKA (2002) verglich rDNA-Sequenzdaten von zwei *Paratrichodorus*- und zwei *Trichodorus*-Arten, darunter auch drei Virusvektoren. Im Bereich des 18S-Genes fand sie eine Sequenzidentität von 99,7 bzw. 98,7 %, beides Werte, die den in vorliegender Arbeit beobachteten durchaus vergleichbar sind. Auch bei diesen Spezies wurden einzelne Insertionen bzw. Deletionen, überwiegend jedoch Transitionen festgestellt, eine Beobachtung, die diejenige von KOCHER und WILSON (1991) bestätigt.

DE LEY *et al.* (2002) fanden maximal 10 % Variabilität innerhalb der fast komplett sequenzierten 18S-Region von *Meloidogyne*-Arten, zwei Spezies unterschieden sich durch nur eine einzige Basensubstitution.

In der vorliegenden Arbeit wurden im 18S-Gen nicht nur Bereiche mit unterschiedlich starker Variabilität festgestellt, sondern auch gattungsspezifische Muster. Diese deuteten darauf hin, dass die *Xiphinema*-Arten sich am deutlichsten von den anderen Spezies unterscheiden und dass *Paralongidorus* näher mit *Longidorus* verwandt zu sein scheint.

Was die Basenzusammensetzung angeht, so wurden zwischen den sechs Virusüberträgern im deutschen Weinbau keine wesentlichen Unterschiede beobachtet, ebenso wenig wie bei den vier von BOUTSIKA (2002) untersuchten Trichodoriden-Arten. Die GC-Gehalte lagen bei den letztgenannten Arten mit rund 49 % nur geringfügig höher als bei den Longidoriden mit ca. 47 %. Obwohl zur Ermittlung des letztgenannten Wertes nur insgesamt sechs Arten herangezogen worden sind, stimmt er sehr genau mit der Angabe von NEILSON *et al.* (2004) überein, die auf 21 Populationen der Gattungen *Longidorus* und *Xiphinema* basiert. Die Basenzusammensetzungen innerhalb der Familie Longidoridae scheinen also relativ konstant zu sein.

Beim Vergleich der drei Arten *X. vuittenezi*, *L. sturhani* und *L. helveticus* mit den jeweils ähnlichsten Vektorspezies (*X. index*, *L. elongatus*, *L. macrosoma*) ergaben sich ebenfalls nur wenige Unterschiede, wobei jedoch außer bei *L. macrosoma* und *L. helveticus* mit nur zwei Differenzen sich die morphologischen Ähnlichkeiten zwischen den Arten nicht gleichermaßen im 18S-Gen widerspiegeln. So war nicht *L. sturhani* die Art mit den wenigsten Unterschieden zu *L. elongatus*, sondern *L. attenuatus*, ebenso wie *X. diversicaudatum* weniger Differenzen zu *X. index* aufwies als *X. vuittenezi*. Diese Beobachtung wird durch die Untersuchungen von DORRIS *et al.* (1999) bestätigt, die bei Nematoden aus der Ordnung Strongylida sehr ähnliche 18S-Sequenzen fanden, obwohl sich die Arten morphologisch deutlich voneinander unterscheiden. Morphologische Ähnlichkeiten bzw. Unterschiede scheinen sich damit nicht gleichermaßen in molekularen Daten widerzuspiegeln, eine Ansicht, die auch NEILSON *et al.* (2004) vertreten. Laut FERRIS (1983) ist nicht zwangsläufig eine Korrelation zwischen mor-

phologischen und molekularen Unterschieden gegeben, da die Evolutionsraten nicht unbedingt gleich sind.

4.2.3 Phylogenetische Analyse

Die phylogenetische Analyse der 18S-Sequenzdaten von *X. index*, *X. diversicaudatum* und *X. vuittenezi* ergab, dass die beiden virusübertragenden Arten näher verwandt sind als die morphologisch recht ähnlichen Spezies *X. index* und *X. vuittenezi*. Dieses Ergebnis erhielten auch WANG *et al.* (2003) bei ihrer Analyse von ITS1-Daten und wiesen darauf hin, dass die von *X. index* und *X. diversicaudatum* übertragenen Viren, nämlich das Grapevine Fanleaf Virus und das Arabis Mosaik Virus, von ihren Sequenzdaten her gesehen ebenfalls eine große Ähnlichkeit aufweisen. Die von COOMANS *et al.* (2001) durchgeführte phylogenetische Analyse von morphologischen Merkmalen hingegen gruppierte *X. index* und *X. vuittenezi* näher zusammen. Die ebenfalls in Weinbergserde vorkommende Art *X. pachtaicum* weist deutliche Sequenzunterschiede zu den übrigen drei *Xiphinema*-Spezies auf und wird sowohl in vorliegender Arbeit als auch bei der von COOMANS *et al.* (2001) durchgeführten Untersuchung gemeinsam mit weiteren Arten in die sogenannte *X. americanum*-Gruppe eingeordnet.

Aus den hier durchgeführten Analysen lässt sich auf eine enge Verwandtschaft zwischen *L. attenuatus* und *L. elongatus* schließen, eine Vermutung, die bereits 1961 von HOOPER aufgrund von morphologischen Merkmalen geäußert worden ist. Die Art *L. sturhani*, die von ihrer Morphologie her gesehen *L. elongatus* sehr ähnlich ist, wird in dem 18S-Stammbaum nicht direkt mit letztgenannter Spezies eingruppiert, ebenso wenig wie in dem aus Sequenzdaten der D2-D3 Region des 28S-Genes konstruierten Stammbaum von RUBTSOVA *et al.* (2001). Demgegenüber besteht nicht nur eine große morphologische Ähnlichkeit zwischen *L. macrosoma* und *L. helveticus* (LAMBERTI *et al.*, 2001), sondern auch zwischen den 18S-Sequenzdaten beider Arten, so dass sie in den Stammbäumen (Abbildungen 3.6 und 3.7) jeweils mit hohen Bootstrap-Werten gemeinsam eingruppiert worden sind. Die Einordnung von *P. maximus* mit *Longidorus*-Arten in vorliegender Arbeit untermauert die Beobachtungen von RUBTSOVA *et al.* (2001), die in ihren Daten keine Unterstützung für den Gattungsstatus von *Paralongidorus* sahen. Obwohl die Gattungsmerkmale für *Paralongidorus* scheinbar klar definiert sind (SIDDIQI *et al.*, 1963), weisen einige davon Übereinstimmungen zu *Longidorus* auf (Tabelle 2.8).

4.2.4 Eignung des 18S-Genes für Diagnostik bzw. Phylogenie

Zur Entwicklung von artspezifischen Primern für die sechs Vektorarten im deutschen Weinbau erwies sich die 18S-Genregion als zu konserviert. Durch Sequenzierung und anschließenden Datenvergleich mit den im Rahmen dieses Projektes erarbeiteten Sequenzen ist es durchaus möglich, die jeweilige Art zu bestimmen, insbesondere, da die Untersuchungen verschiedener Populationen der drei *Xiphinema*-Spezies *X. diversicaudatum*, *X. index* und *X. vuittenezi* keinerlei innerartliche Variation aufdeckten, jedoch zwischenartliche Variation vorhanden war. Die 18S-Genregion erscheint von diesen Voraussetzungen her gesehen als nahezu ideal für diagnostische Zwecke. Allerdings ist die Anzahl und insbesondere die Verteilung der Unterschiede nicht geeignet, um spezifische Primer zu entwickeln, und die Artbestimmung über Sequenzierung und Datenvergleich ist zu arbeits- und vor allen Dingen zu kostenintensiv, um eine Rolle für routinemäßige Nematodenuntersuchungen im Weinbau spielen zu können. Es erscheint zudem möglich, die Vektorspezies über einen Restriktionsverdau der 18S-Region zu differenzieren, jedoch ist auch dieses Verfahren aufwändiger als eine direkte Artidentifikation mit Hilfe von spezifischen Primern.

Allerdings erwies sich in vorliegender Arbeit die 18S-Region als durchaus geeignet zur Konstruktion eines allgemeinen Vorwärtsprimers, eine Strategie, die auch von BOUTSIKA (2002) verfolgt worden ist.

18S-Sequenzdaten sind bereits vielfach zur Konstruktion von Stammbäumen genutzt worden, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass dieses Gen eine relativ konstante Länge aufweist und die Sequenzen selbst von entfernt verwandten Organismen gut aneinander gelagert werden können (FLOYD *et al.*, 2002). DE LEY *et al.* (2002) wählten dieses Gen für ihre Phylogenie von *Meloidogyne*-Arten aus, da bei der ITS-Region Polymorphismus innerhalb von Individuen vorliegt und es sich als schwierig erwies, mit Arten aus anderen Gattungen ein verlässliches Alignment zu erzeugen. In vorliegender Arbeit stellten sich die Aneinanderlagerung der Sequenzen und die folgende phylogenetische Analyse ebenfalls als unproblematisch dar. Die Einordnung der im Weinbau vorkommenden Arten korreliert, grob gesehen, mit einigen ihrer morphologischen Merkmale, wobei allerdings der Gattungsstatus von *Paralongidorus* in vorliegender Analyse nicht bestätigt werden konnte. Es wäre daher denkbar, dass das 18S-Gen aufgrund seiner sehr stark konservierten Struktur eher für die phylogenetische Analyse von weiter entfernt verwandten Organismengruppen, wie beispielsweise Familien oder Ordnungen, geeignet ist. So war es aufgrund von zu geringen Sequenzunterschieden nicht möglich, mit Hilfe von 18S-Daten die phylogenetischen Beziehungen zwischen *Caenorhabdi-*

tis-Arten zu klären (FITCH *et al.*, 1995) und KANZAKI und FUTAI (2002) schlossen bei ihren Untersuchungen von *Bursaphelenchus*-Spezies, dass das 18S-Gen nicht für phylogenetische Studien von nahe verwandten Arten geeignet sei.

Bei all diesen Interpretationen darf jedoch nicht vergessen werden, dass Stammbäume, die nur auf Sequenzdaten eines einzigen Genes beruhen, nicht zwangsläufig die tatsächlichen phylogenetischen Beziehungen zwischen Arten widerspiegeln (DORRIS *et al.*, 1999). Die Entwicklung eines bestimmten Gens entspricht nämlich nicht unbedingt der Artentwicklung (NADLER, 1995, 2002). DORRIS *et al.* (1999) schlagen deshalb vor, Daten von mehreren, nicht miteinander in Verbindung stehenden genetischen Loci zu verwenden. In Untersuchungen von GIRIBET und RIBERA (2000) erwiesen sich 18S- und 28S-Sequenzdaten allein als nicht ausreichend, um die evolutionären Beziehungen bei Arthropoden zufriedenstellend zu erklären. Noch einen Schritt weiter geht deshalb die Forderung, alle verfügbaren Daten und Informationen zur Klärung phylogenetischer und taxonomischer Fragestellungen heranzuziehen (FERRIS *et al.*, 1999a; GIRIBET und RIBERA, 2000; KAPLAN *et al.*, 2000).

Laut FITCH und MARGOLIASH (1967) kann eine Verbesserung von Stammbäumen auch durch Einbeziehung weiterer Arten erzielt werden. FERRIS *et al.* (1993) halten es für wichtig, eine gewisse Bandbreite an Spezies zu untersuchen, um die Eignung einer DNA-Region für phylogenetische Studien der entsprechenden Organismengruppe zu beurteilen.

NADLER (1995) schlägt vor, Stammbäume als vorläufige Hypothesen anzusehen, die sich unter Berücksichtigung von neuen Daten oder verbesserten Analysemethoden ändern können. Die beste Darstellung der tatsächlich vorliegenden phylogenetischen Beziehungen erhält man, seiner Meinung nach, nur bei Berücksichtigung aller vorhandenen Informationen über die untersuchten Arten.

4.3 Sequenzierung der ITS1-Region und Primerkonstruktion

4.3.1 Nematodenidentifikation

Im Verlauf der letzten Jahre ist eine ständige Abnahme von klassischen Taxonomen im Bereich der Nematologie zu beobachten (BEHAN-PELLETIER, 1999; ANDRE *et al.*, 2001). Gleichzeitig werden aber ständig neue Arten entdeckt, was die morphologische Bestimmung immer komplizierter werden lässt. Daneben weisen Messdaten für Nematoden oft eine große Variabilität auf, was neben natürlichen Effekten, wie z.B. dem Biotop, aus dem sie stammen, auch auf Faktoren wie Fixierungsmethode und Messunterschiede zurückzuführen ist (FRED-

ERICK und TARJAN, 1978; BROWN, 1981; BROWN, 1985a; BROWN und TOPHAM, 1985). Aus diesen Gründen wurde und wird ein erheblicher Forschungsaufwand betrieben, um alternative Möglichkeiten zur Identifikation von Arten zu entwickeln, die mit klassischen Methoden nur sehr schwer zu differenzieren sind, wie z.B. *Bursaphelenchus* spp. (BECKENBACH *et al.*, 1992; HOYER *et al.*, 1998; IWAHORI *et al.*, 1998; LIAO *et al.*, 2001), *Ditylenchus* spp. (WENDT *et al.*, 1993), *Pratylenchus* spp. (ANDRES *et al.*, 2000; DUNCAN *et al.*, 1999; UEHARA *et al.*, 1998; WAEYENBERGE *et al.*, 2000) und *Steinernema* spp. (NASMITH *et al.*, 1996; NGUYEN *et al.*, 2001).

Im Vorfeld der Entwicklung alternativer Diagnoseverfahren ist jedoch in der Regel erst einmal eine morphologische Bestimmung der verwendeten Testorganismen nötig.

In der vorliegenden Arbeit erwies sich die Nematodenidentifikation besonders bei den *Longidorus*-Arten zum Teil als problematisch. So war beispielsweise die *L. elongatus*-Population aus Bad Dürkheim ursprünglich als *L. sturhani* identifiziert worden. Durch die Analyse der Sequenzdaten stellte sich jedoch heraus, dass diese Herkunft und diejenige aus Gau Algesheim kaum Ähnlichkeiten zeigten. Ein Vergleich mit den Daten für *L. elongatus* hingegen resultierte in einer enorm hohen Übereinstimmung. Die daraufhin vorgenommene Nachbestimmung der Population an der BBA in Münster ergab, dass es sich tatsächlich um *L. elongatus* handelte. Vor der Erstbeschreibung von *L. sturhani* und *L. helveticus* im Jahr 2001 wurden aufgrund der großen morphologischen Ähnlichkeiten zweifelsohne mehrere Individuen dieser Spezies als *L. elongatus* bzw. *L. macrosoma* bestimmt. Teilweise wurde auch bereits früher vermutet, dass es sich um Komplexe mehrerer Arten handelt, so z.B. bei *L. elongatus* und *L. profundorum* (BROWN und TAYLOR, 1987).

Die Verwendung von Larven für die Sequenzierung stellte ebenfalls ein gewisses Problem dar, da neben der tendenziellen Einordnung, basierend auf ihren morphologischen Merkmalen, die Zuordnung hauptsächlich aufgrund der in derselben Bodenprobe vorkommenden Adulten vorgenommen wurde. Es erscheint daher sinnvoll, im Vorfeld solcher Untersuchungen Zuchtansätze mit den betreffenden Nematodenarten anzulegen, um auszuschließen, dass Mischpopulationen vorliegen. Auch wäre es hilfreich, von jedem der zur Sequenzierung verwendeten Tiere erst alle morphometrischen Daten zu ermitteln, um so bei Unstimmigkeiten eventuell eine Nachbestimmung vornehmen zu können.

4.3.2 PCR-Produkte

Insgesamt wurde die ITS1-Region von 16 Nematodenpopulationen sequenziert. Bei vier der sieben untersuchten Arten handelt es sich um Virusüberträger im deutschen Weinbau. Mit

Hilfe der universellen Primer B118 und RN58SR gelang es, für alle Nematodenarten die ITS1-Region der rDNA zu amplifizieren. Die dabei erreichten Fragmentgrößen waren unterschiedlich für die einzelnen Spezies und rangierten im Bereich von etwa 950 bis 1200 bp. Die Länge der ITS1-Region variierte damit zum Teil deutlich zwischen den sieben Arten. Genaue Angaben können nicht gemacht werden, da der Beginn des 5.8S-Genes bei den vorliegenden Daten nicht zu erkennen war, möglicherweise weil die Sequenzdaten zu sehr von den zum Vergleich herangezogenen Daten der drei *Xiphinema*-Arten abwichen bzw. weil die Sequenzen etwas zu kurz waren. Der verwendete Rückwärtsprimer RN58SR lagert nämlich ganz am 5'-Ende des 5.8S-Genes an und oftmals sind die Peaks der Sequenzchromatogramme im Anfangs- und Endbereich nicht deutlich genug, um sie in die Analysen einzubeziehen. Vom 18S-Gen wurden hingegen bei allen Arten rund 120 bp mitamplifiziert, so dass die ITS1-Region etwa zwischen 800 und 1100 bp umfassen dürfte.

Auch die in der Literatur zu findenden Angaben beziehen sich meist auf die Größe der PCR-Produkte, die neben der ITS1-Region Teilbereiche der angrenzenden Gene 18S und 5.8S beinhalten, bzw. falls beide ITS-Regionen amplifiziert wurden, Teilbereiche von 18S und 28S und das gesamte 5.8S-Gen. So erhielten HOYER *et al.* (1998) bei *Bursaphelenchus*-Arten rund 850-1030 bp große Fragmente für beide ITS-Regionen, NGUYEN *et al.* (2001) bei *Steinernema* spp. zwischen 916 und 1061 bp. IBRAHIM *et al.* (1994) berichten von 860-1100 bp langen Amplifikationsprodukten bei *Aphelenchoides* spp. und *Ditylenchus angustus* und stellten die Vermutung an, dass hauptsächlich Sequenzumlagerungen wie Insertionen und Deletionen für die Längenunterschiede verantwortlich sind. Die in den obengenannten Beispielen gemachten Größenangaben beziehen sich alle auf beide ITS-Regionen, liegen aber im Bereich der Fragmentgrößen, die in vorliegender Arbeit für die ITS1-Region allein gefunden wurden. Es erscheint daher wahrscheinlich, dass die ITS1-Region bei den Longidoridae-Arten nicht nur variabel hinsichtlich ihrer Länge, sondern im Vergleich mit anderen Nematodenarten auch verhältnismäßig groß ist.

Untersuchungen von LAMBERTI *et al.* (2001) ergaben für die Amplifikation der ITS-Regionen von *L. elongatus*, *L. macrosoma*, *L. profundorum*, *L. raskii*, *L. arthensis*, und *L. helveticus* PCR-Fragmentgrößen von 1600, 2000, 1800, 1600, 1700 und 2000 bp. Diese Zahlen stimmen insofern mit den in vorliegender Arbeit für die ITS1-Region allein erzielten überein, als *L. macrosoma* und *L. helveticus* gleichermaßen große PCR-Produkte bildeten (ca. 1200 bp) und die von *L. profundorum* (ca. 1050 bp) und *L. elongatus* (ca. 950 bp) in etwa gleichem Verhältnis darunter lagen.

VRAIN *et al.* (1992) beobachteten bei 16 Nematodenpopulationen aus der *X. americanum*-Gruppe immer eine PCR-Fragmentgröße von rund 1500 bp für beide ITS-Regionen inklusive des 5.8S-Genes. MOLINARI *et al.* (1997) hingegen erhielten bei der Amplifikation des selben Teilstückes für *Xiphinema index* ein ca. 2000 bp, für *X. vuittenezi* ein etwa 1800 bp großes Fragment. WANG *et al.* (2003) fanden bei ihren Untersuchungen der ITS1-Region wesentlich geringere Längenunterschiede zwischen den einzelnen *Xiphinema*-Arten: 1132 bp bei *X. vuittenezi*, 1153 bp bei *X. index*, 1175 bp bei *X. diversicaudatum* und 1190 bp bei *X. italiae*. POWERS *et al.* (1997) ordneten die Gattung *Xiphinema* einer Gruppe von Nematoden zu, in der wenig oder keine Größenunterschiede im Bereich der ITS-Regionen bei den einzelnen Arten auftreten. Insgesamt fanden die Autoren jedoch bei den 56 untersuchten pflanzenparasitären Nematodenarten zum Teil erhebliche Abweichungen der Größe der ITS1-Region: so war beispielsweise das 1200 bp lange PCR-Produkt von *Trichodorus* dreimal so groß wie das entsprechende *Meloidogyne*-Fragment. Die Größe der ITS1-Region ohne die ebenfalls amplifizierten Abschnitte von 18S- und 5.8S-Gen wurde für *Meloidogyne* auf rund 215 bp geschätzt, was mit den Beobachtungen von ZIJLSTRA *et al.* (1995) übereinstimmt, die von etwa 210 bp sprechen. Bei *C. elegans* umfasst die ITS1-Region mit 464 bp rund doppelt so viele Nukleotide (ELLIS *et al.*, 1986), ähnlich wie bei *Belonolaimus* sp. mit rund 480 bp (CHERRY *et al.*, 1997). Auch innerhalb einzelner Nematodengattungen kommen teilweise erhebliche Größenunterschiede vor (z.B. bei *Tylenchorhynchus* und *Pratylenchus*), wogegen bei anderen Gattungen, wie z.B. *Heterodera*, *Globodera* und *Meloidogyne* keine oder kaum eine Variation zu beobachten ist (POWERS *et al.*, 1997).

Von Größenunterschieden innerhalb einer Gattung berichten unter anderen HOYER *et al.* (1998) und KANZAKI und FUTAI (2002) bei *Bursaphelenchus*-Arten, DUNCAN *et al.* (1999) und WAEYENBERGE *et al.* (2000) bei *Pratylenchus*-Arten und WENDT *et al.* (1993) bei *Ditylenchus*-Arten.

Mit Hilfe der in der vorliegenden Arbeit beobachteten Fragmentlängenunterschiede erschien es möglich, einige Arten, wie beispielsweise *L. elongatus* und *L. profundorum* mit dem kleinsten bzw. zweitkleinsten PCR-Produkt schon in dieser Phase zu identifizieren. Die Amplifikationsprodukte anderer Arten waren jedoch ähnlich groß, so dass eine Differenzierung mit Hilfe der hier beschriebenen Auftrennung in einem Agarose-Gel nicht zu realisieren ist. Hinzu kommt, dass in den Weinbergsböden weitere Longidoridae-Arten mit bislang nicht bekannten ITS1-Größen vorkommen, so dass zusätzliche Verwechslungsmöglichkeiten nicht auszuschließen sind.

In den hier beschriebenen Untersuchungen traten insbesondere bei *L. helveticus* und bei einigen Individuen der Art *L. attenuatus* weitere PCR-Produkte auf. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass für beide Primer oder zumindest einen von ihnen neben der erwünschten noch weitere mögliche Anlagerungsstellen im Genom vorliegen.

Eine andere Erklärung wäre das von POWERS *et al.* (1997) und ZIJLSTRA *et al.* (1997) beschriebene Vorkommen verschiedener ITS-Muster im Genom von einzelnen Nematoden.

IBRAHIM *et al.* (1994) und IWAHORI *et al.* (1998) erhielten für *Aphelenchoides* spp. jeweils zwei PCR-Produkte und schlossen deshalb auf das Vorliegen von Heterogenität der rDNA-Sequenzen, ähnlich wie DE GIORGI *et al.* (1992), die zwei Banden bei der Amplifikation eines Teiles des 28S-Genes bei Individuen der Arten *Xiphinema pachticum* und *X. diversicaudatum* beobachteten. Auch VRAIN *et al.* (1992) berichten von unspezifischen Produkten bei der Amplifikation der ITS-Regionen von Populationen aus der *X. americanum*-Gruppe, führen das jedoch auf Variationen bei den PCR-Bedingungen zurück.

4.3.3 Sequenzdatenanalyse

Zwischen Individuen einer Population traten in der vorliegenden Arbeit keine Sequenzunterschiede auf, abgesehen von der *L. helveticus*-Herkunft Roche d'Or, bei der zwei der insgesamt drei Nematoden eine Deletion aufwiesen. Erwartungsgemäß wurden keine Differenzen zwischen verschiedenen Entwicklungsstadien bzw. Geschlechtern gefunden.

LAMBERTI *et al.* (1999) stellten bei ihren RFLP-Untersuchungen des 5'-Endes des 28S-Genes sowohl intraspezifische als auch Variation innerhalb einer Population bei *X. vuittenezi* fest. BLOK *et al.* (1998) fanden bei *Globodera pallida* Unterschiede im Bereich der rDNA nicht nur zwischen Individuen einer Population, sondern auch innerhalb eines Individuums. Die Heterogenität bei Einzeltieren führen sie auf das Vorliegen verschiedener rDNA-Einheiten zurück, ähnlich wie ZIJLSTRA *et al.* (1995, 1997), CHERRY *et al.* (1997) und POWERS *et al.* (1997), die verschiedene ITS1-Muster bei Individuen vermuteten. FENTON *et al.* (1998) stellten fest, dass bei der Grünen Pfirsichblattlaus ebenfalls Unterschiede der ITS1-Region innerhalb von Einzeltieren vorkommen. Daneben beobachteten sie 58 bp umfassende Deletionen ausgelöst durch die verwendete PCR-Methode. Diese Erklärung könnte auch auf die in vorliegender Arbeit gefundenen Nukleotidverluste bei *L. helveticus* zutreffen, so dass die vermeintlichen Deletionen in der Sequenz möglicherweise nicht die wirkliche Situation im Genom widerspiegeln.

Bei *L. macrosoma*, *P. maximus* und *L. profundorum* wurden bei den beschriebenen Untersuchungen keine Sequenzunterschiede zwischen den einzelnen Herkünften festgestellt. Allerdings wurde sowohl bei *L. macrosoma* als auch bei *L. profundorum* eine zusätzliche Population von den Analysen ausgeschlossen, da bei der erstgenannten Art die Sequenzfragmente zu kurz für die Bildung eines Gesamtkonsensus waren und bei *L. profundorum* Zweifel an der korrekten Identifikation aufgetreten sind. Für das letztgenannte Problem könnte auch der Umstand verantwortlich sein, dass es sich bei *L. profundorum* möglicherweise um einen Spezieskomplex handelt (BROWN und TAYLOR, 1987; TAYLOR und BROWN, 1997). In beiden Fällen waren Unterschiede zu den übrigen Populationen der gleichen Art aufgetreten. Von daher erscheint es sinnvoll, weitere Herkünfte - insbesondere aus anderen Ländern - zu untersuchen, um die vorhandene Variabilität besser abschätzen zu können.

L. elongatus und *L. sturhani* wiesen nur jeweils einen Unterschied in der Nukleotidsequenz zwischen den Populationen auf, wobei insbesondere bei der erstgenannten Art drei geographisch deutlich voneinander getrennt vorkommende Herkünfte sequenziert worden waren.

Bei *L. attenuatus* erwies es sich als schwierig, den mittleren Bereich der ITS1-Region zu sequenzieren, da bei fast allen Sequenzfragmenten dieser Bereich undeutliche Chromatogramm-Peaks zeigte. So ist es durchaus möglich, dass die Angabe von zwölf Differenzen (vgl. 3.2.5) zwischen den beiden Herkünften eine Unter- oder auch eine Überschätzung der tatsächlich vorhandenen Unterschiede darstellt. Solche nicht eindeutigen Nukleotide beobachteten auch FITCH *et al.* (1995) bei Rhabditidae und DE LEY *et al.* (2002) bei einigen der untersuchten *Meloidogyne*-Arten, allerdings beide im 18S-Gen.

Die Art mit der größten intraspezifischen Variabilität im Bereich der ITS1-Region war in der vorliegenden Arbeit *L. helveticus*. Es traten sowohl Unterschiede zwischen Individuen derselben Herkunft wie auch zwischen den beiden Populationen auf. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass bei den beiden Arten mit der größten Variation Gelpurifikationen durchgeführt worden waren. Ob ein Zusammenhang zwischen dieser Methode und der Qualität der Sequenzdaten besteht, sollte in weiteren Versuchen geklärt werden. In vorliegender Arbeit wurde beobachtet, dass die erhaltenen Sequenzfragmente oft kurz bzw. nur einzelne Abschnitte davon für die Analysen verwendbar waren.

THIERY und MUGNIERY (1996) beobachteten bei dem Vergleich von ITS1-Sequenzdaten von drei *Globodera rostochiensis*-Populationen insgesamt fünf Unterschiede, eine Zahl durchaus vergleichbar mit den zuvor beschriebenen bei *Longidorus*.

Sequenzunterschiede zwischen Populationen einer Art fanden z.B. auch DE GIORGI *et al.* (1999) bei *X. vuittenezi*, WAEYENBERGE *et al.* (2000) bei *Pratylenchus coffeae* und in ge-

ringem Ausmaß auch FERRIS *et al.* (1993, 1994) bei *Heterodera glycines* bzw. *Heterodera avenae* und FALLAS *et al.* (1996) bei *Radopholus similis*. SZALANSKI *et al.* (1997) stellten bei *Heterodera goettingiana* und *H. zae* nicht nur Populationsunterschiede fest, sondern erhielten sogar Sequenzunterschiede bei Klonen, gewonnen aus einem einzigen PCR-Produkt. Die Autoren schlossen daher nicht aus, dass ein Teil der festgestellten Variation auf Nukleotid-Einbaufehler während der Amplifikation zurückzuführen ist. SUBBOTIN *et al.* (2000) fanden Unterschiede in der ITS1-Region bei Klonen von *Globodera rostochiensis* und *G. pallida* und vermuteten, dass Heterogenität bezüglich dieser Region vorliegt, dass aber auch Artefakte während der Amplifikation bzw. dem Klonen für einen Teil der beobachteten Variation verantwortlich sein könnten.

Im Gegensatz dazu fanden KNOETZE *et al.* (2003) bei ihren ITS1-RFLP-Untersuchungen bei fünf verschiedenen *Xiphinema*-Arten - darunter auch *X. index* - keine Differenzen zwischen Populationen, ebenso wie MITKOWSKI *et al.* (2002) bei 18 Populationen von *Meloidogyne hapla*, wobei die letztgenannten jedoch alle aus der Gegend um New York stammten. KAPLAN *et al.* (2000) sammelten über 50 geographisch zum Teil weit voneinander getrennte Isolate von *Radopholus similis* und fanden bei allen identische ITS1-Sequenzen vor. Das Vorkommen von Variation zwischen Populationen einer Art scheint also eine deutliche Abhängigkeit von der betrachteten Organismengruppe aufzuweisen.

Die ITS1-Daten zeigen eine erhebliche interspezifische Variation, was nicht nur die Aneinanderlagerung mit Hilfe des Programmes Clustal X sehr erschwerte, sondern auch den Vergleich der Arten. Eine Analyse der Unterschiede wie bei den 18S-Gendaten war nicht möglich und auch auf eine phylogenetische Auswertung wurde verzichtet, da hierfür ein verlässliches Alignment der Sequenzen nötig ist. IWAHORI *et al.* (1998) hatten ebenfalls Schwierigkeiten, die ITS-Regionen von *Bursaphelenchus*-, *Aphelenchus*- und *Aphelenchoides*-Arten ordnungsgemäß aneinanderzulagern und NGUYEN *et al.* (2001) beobachteten große Sequenzvariationen im Bereich der ITS-Regionen bei *Steinernema*. Ganz im Gegensatz dazu traten zwischen *Meloidogyne hapla* und *M. arenaria* nur verhältnismäßig wenige Unterschiede in der ITS1-Region auf und der Sequenzvergleich war problemlos durchführbar (MITKOWSKI *et al.*, 2002). POWERS *et al.* (1997) fanden zwischen *Meloidogyne arenaria* und *M. incognita* überhaupt keine Differenzen in der ITS1-Region, *M. javanica* wies einen einzigen Unterschied zu den beiden vorgenannten Spezies auf. Zwischen einem und 119 Unterschieden im Bereich der ITS1-Region wurden beim Vergleich verschiedener Arten der Gattung *Heterorhabditis* festgestellt, wobei es insbesondere dann zu Schwierigkeiten bei dem Alignment der Sequen-

zen kam, wenn noch Arten aus drei weiteren Nematodengattungen einbezogen wurden (ADAMS *et al.*, 1998). Bei den vier von ihnen untersuchten *Xiphinema*-Arten ermittelten WANG *et al.* (2003) eine Sequenzidentität von 43,5 %, wobei sie ähnlich wie beim 18S-Gen Bereiche mit unterschiedlich starker Variabilität beobachteten. Demgegenüber fanden FERRIS *et al.* (1995) zwischen drei Arten und zwei Populationen von *Globodera* nur zwischen 2 und 17 % Sequenzunterschiede in der ITS1-Region. Die Daten zeigen, dass die vorkommende Variabilität ebenso wie bei den Populationsunterschieden wesentlich von der untersuchten Nematodengruppe abzuhängen scheint.

4.3.4 Primerkonstruktion

Die Primer für die *Longidorus*- und *Paralongidorus*-Arten waren zunächst so konstruiert worden, dass sie zu dem universellen Vorwärtsprimer B118 passten. Dieser im 18S-Gen anlagende Primer sollte beibehalten werden und gemeinsam mit allen spezifischen Rückwärtsprimern einsetzbar sein. Damit sollte gewährleistet werden, dass das PCR-Verfahren möglichst einfach zu handhaben ist. Allerdings stellte sich im Verlaufe der praktischen Primertestungen heraus, dass neben den erwünschten PCR-Produkten unspezifische Amplifikate auftraten. Einerseits zeigte sich das in Mehrfachbanden mit spezifischer DNA, andererseits ergaben sich Produkte bei Verwendung artfremder DNA. Versuche mit verringerter PCR-Zykluszahl bzw. erhöhter Primeranlagerungstemperatur konnten in manchen Fällen die Bildung der unerwünschten Produkte unterdrücken, jedoch arbeiteten nicht alle Primer bei deutlich erhöhter Annealing-Temperatur noch zuverlässig. Deshalb wurde mit Hilfe der eigenen 18S-Daten ein neuer Vorwärtsprimer (GenF) konstruiert, der wiederum zu den bereits vorhandenen Rückwärtsprimern passen sollte. Dieser lieferte bei Verwendung des für die *Xiphinema*-Primer entwickelten PCR-Programmes zuverlässige und spezifische Ergebnisse und wurde deshalb für die weiteren Testreihen ausgewählt. Die potentiellen Rückwärtsprimer waren so konstruiert worden, dass zumindest die Sequenzen von morphologisch ähnlichen Arten sich nicht gegenseitig blockieren. Damit sollte gewährleistet werden, dass ein Multiplex-Einsatz zumindest theoretisch möglich ist. Ebenfalls aus diesem Grund wurde darauf geachtet, dass die zusammen mit B118 bzw. GenF gebildeten PCR-Produkte deutliche Größenunterschiede zwischen den Arten zeigen, um eine Identifikation direkt nach der Gelelektrophorese vornehmen zu können.

Grundsätzlich ist es für die Untersuchung von Vermehrungsflächen im Weinbau ausreichend, die Virusüberträger sicher zu detektieren. Allerdings ist bei den erst 2001 beschriebenen Ar-

ten *L. helveticus* und *L. sturhani* die Fähigkeit zur Übertragung noch nicht hinreichend überprüft, *L. profundorum* und *X. vuittenezi* sind bereits als Vektoren vermutet worden (FRITZSCHE und KEGLER, 1968; RÜDEL, 1980).

Ausserdem kann ein negatives Resultat in der Gelelektrophorese verschiedene Ursachen haben. So können beispielsweise in den vorgelagerten Schritten wie DNA-Extraktion und PCR, aber auch in der Gelelektrophorese selbst Probleme auftreten, so dass eine nicht vorhandene Bande nicht unbedingt gleichzusetzen ist mit dem Nichtvorhandensein der entsprechenden Art. Von daher bietet das hier beschriebene Verfahren eine zusätzliche Möglichkeit der Absicherung, da neben den Vektoren auch morphologisch ähnliche Arten detektiert werden können und damit unter Umständen gewährleistet werden kann, dass das Verfahren funktioniert hat.

Die von LIAO *et al.* (2001) entwickelte Nachweismethode basiert darauf, dass nur für *Bursaphelenchus xylophilus* je nach verwendetem Primerpaar ein 220 oder 330 bp großes Fragment in der PCR gebildet wird, für *B. mucronatus* hingegen keines. Bei einem negativen Resultat in der PCR wird daher unter Umständen darauf geschlossen, dass es sich um *B. mucronatus* gehandelt hat, was aus den vorgenannten Gründen eine etwas unsichere Identifikationsmethode darstellt.

UEHARA *et al.* (1998) entwickelten jeweils ein spezifisches Primerpaar für die zwei zu unterscheidenden *Pratylenchus*-Arten *P. coffeae* und *P. loosi*. Die dabei entstehenden Fragmente weisen jedoch eine so ähnliche Größe auf, dass eine Unterscheidung mit Hilfe einer herkömmlichen Gel-Elektrophorese nicht möglich scheint und von daher wohl auch kein Multiplex-Einsatz durchgeführt werden kann.

ZIJLSTRA (1997) beschreibt ein Verfahren zur Unterscheidung von vier *Meloidogyne*-Spezies mit Hilfe von insgesamt vier Primern, darunter drei Vorwärts- und ein gemeinsamer Rückwärtsprimer. Alle Primer sind in einer Multiplex-Reaktion einsetzbar, wobei ein Primerpaar für zwei verschiedene Arten leicht unterschiedlich große Amplifikationsprodukte (525 bzw. 517 bp) bildet, die jedoch in einer normalen Gel-Elektrophorese nicht zu unterscheiden sind, weshalb ein Restriktionsverdau zur Differenzierung dieser Arten nötig ist. Die übrigen beiden Spezies sind problemlos anhand der Fragmentgröße zu identifizieren.

Eine sehr effiziente und kostengünstige Nematodenidentifikation erlaubt die von WANG *et al.* (2003) entwickelte Methode zum Nachweis von *Xiphinema*-Arten, da alle vier spezifischen Primer mit einem gemeinsamen Rückwärtsprimer in einem PCR-Ansatz verwendbar sind. Die Bestimmung der Art kann direkt anhand der Fragmentgrößen vorgenommen werden.

4.3.5 Eignung der ITS1-Region für diagnostische Zwecke bzw. für phylogenetische Analysen

Für die Entwicklung eines molekularen Diagnoseverfahrens erwies sich in den hier beschriebenen Untersuchungen die ITS1-Region als besser geeignet als das 18S-Gen.

Die große Variation zwischen den Arten erleichterte das Auffinden von spezifischen Bereichen, die zur Primerkonstruktion herangezogen werden konnten. Als Nachteil kann dagegen die intraspezifische Variabilität angesehen werden, da immer die Gefahr besteht, dass einzelne Populationen gerade an den Anlagerungsstellen der spezifischen Primer Unterschiede aufweisen. In diesen Fällen können die Primer entweder gar nicht mehr oder nur noch unzureichend arbeiten und anstatt artspezifisch können sie nur als spezifisch für einzelne Populationen gelten. In der vorliegenden Arbeit wurden die variablen Sequenzbereiche nach Möglichkeit für die Primerkonstruktion ausgespart. Nur der Primer von *L. helveticus* lagert an einer Region an, wo nachträglich ein Unterschied zwischen den beiden zur Verfügung stehenden Populationen festgestellt worden war. Da es sich aber nur um eine variable Base handelt, ist der Primer in seiner Funktionsfähigkeit nicht gestört. Um jedoch zu überprüfen, ob die Primer wirklich artspezifisch sind, müssen sie mit weiteren Herkünften, möglichst auch aus anderen Ländern, getestet werden.

Die ITS1-Daten wurden in der vorliegenden Arbeit nicht für eine phylogenetische Analyse verwendet. Zwar wäre es interessant gewesen, den daraus konstruierten Stammbaum mit dem 18S-Stammbaum zu vergleichen, das von Clustal X produzierte Alignment zeigte aber so wenige Übereinstimmungen und so große Lücken, dass nicht gewährleistet ist, dass die Qualität desselben ausreichend hoch ist. Aus dem gleichen Grund verwendeten IWAHORI *et al.* (1998) anstatt der sehr variablen ITS-Regionen die Sequenzdaten des 5.8S-Genes zur phylogenetischen Analyse von *Bursaphelenchus*-, *Aphelenchus*- und *Aphelenchoides*-Arten. NGUYEN *et al.* (2001) sehen die ITS-Regionen als zu variabel und das 5.8S-Gen als zu konserviert an, um die phylogenetischen Beziehungen zwischen allen *Steinernema*-Arten aufzuklären. Die Autoren stellten außerdem fest, dass die Qualität des Alignments (insbesondere die Tatsache, ob die vielen unsicheren Regionen entfernt oder belassen werden) einen Einfluss auf die Topologie von daraus konstruierten Stammbäumen hat.

Im Gegensatz dazu fanden FERRIS *et al.* (1993) bei Zystennematoden stark konservierte ITS-Regionen und schlugen deshalb vor, zur Ermittlung der phylogenetischen Beziehungen für einige Vertreter aus dieser Organismengruppe etwas variabelere DNA-Bereiche zu verwenden.

Für die hier untersuchten Longidoridae-Spezies wäre hingegen eine etwas konserviertere Region als ITS1, aber etwas variabler als das 18S-Gen von Vorteil. SZALANSKI *et al.* (1997) mahnen zur Vorsicht bei der Verwendung der ITS1-Region zur Ableitung phylogenetischer Beziehungen, da aufgrund der zum Teil auftretenden Heterogenität Fehlinterpretationen möglich sind. ADAMS *et al.* (1998) halten die ITS1-Region für geeignet, um die Verhältnisse zwischen nahe verwandten Arten und Populationen von *Heterorhabditis* aufzuklären, nicht aber zwischen weiter voneinander entfernt stehenden.

4.4 Primertestungen

4.4.1 Nachweissicherheit, Spezifität und Sensitivität

Mit allen 10 getesteten Primern konnten jeweils mehrere Populationen der entsprechenden Art sicher nachgewiesen werden. Ausserdem ergaben sie mit der hier verwendeten artfremden DNA keinerlei unspezifische Amplifikationsprodukte, abgesehen von einer gelegentlich zu beobachtenden Bande bei dem Primer für *X. index*, eingesetzt mit *L. elongatus*-DNA. Warum dieses unspezifische Produkt nur manchmal zu sehen war, konnte nicht geklärt werden. Eine Kontamination kann aber ausgeschlossen werden, da andere Proben keine Bande dieser Größe aufwiesen. Das auftretende unspezifische PCR-Fragment stellt in vorliegendem Fall kein Problem dar, weil es - wenn überhaupt - dann nur in sehr geringer Menge produziert wird und damit nur eine sehr schwache Bande ergibt. Diese liegt zudem in einem Größenbereich, bei dem eine Verwechslung mit den spezifischen Banden für die drei *Xiphinema*-Arten praktisch ausgeschlossen werden kann.

Was die Sensitivität des Nachweises angeht, so wurden bei den *Longidorus*- und *Paralongidorus*-Primern verschiedene Nematodenentwicklungsstadien ebenso überprüft wie der Nachweis der virusübertragenden Arten unter ganzen Nematodengemeinschaften. Ergebnis dieser Untersuchungen war, dass ein einziges Individuum, insbesondere eine einzige Larve im ersten Entwicklungsstadium, für eine sichere Identifikation ausreicht und dass der Nachweis durch Fremdbesatz in der Regel nicht gestört zu werden scheint. Bei den beiden Virusüberträgerarten aus der Gattung *Xiphinema* wurden zudem Verdünnungsreihen durchgeführt, um festzustellen, unter wie vielen Individuen der häufigsten Art *X. vuittenezi* noch einzelne Vektoren nachweisbar sind. Die Ergebnisse deuteten auf eine enorm hohe Sensitivität hin, da bei den DNA-Verdünnungsreihen ein Anteil Vektor-DNA noch unter 800 Teilen Nichtvektor-DNA detektiert werden konnte, bei einer Verdünnung von 1:1000 war *X. index* noch immer nach-

zuweisen, während bei *X. diversicaudatum* höchstens noch die Andeutung einer Bande zu sehen war. Bei der gemeinsamen DNA-Extraktion konnte jeweils ein einziger Nematode der Überträgerarten unter 200 Nichtüberträgern identifiziert werden. Die dabei produzierten Banden waren so kräftig, dass von einer noch höheren Nachweisgrenze ausgegangen werden darf, sofern die DNA-Extraktion bei so vielen Individuen noch störungsfrei verläuft.

UEHARA *et al.* (1998) testeten die Spezifität der von ihnen entwickelten Primer mit weiteren Arten aus derselben Gattung, wobei jedoch ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit nur eine beschränkte geographische Variationsbreite untersucht wurde, da alle Populationen aus Japan stammten. Wie für die neu konstruierten *Longidorus*- und *Paralongidorus*-Primer wurde versucht, die Sensitivität der Methode zu ermitteln, indem verschiedene Nematodenentwicklungsstadien eingesetzt wurden.

WANG *et al.* (2003) haben die neuen Primer mit einer Ausnahme (*Xiphinema italiae*) jeweils mit mehreren geographisch deutlich getrennt vorkommenden Herkünften auf ihre Zuverlässigkeit und mit dem Einsatz unterschiedlicher Nematodenentwicklungsstadien auf ihre Sensitivität hin überprüft. Die Spezifität wurde ermittelt, indem die jeweiligen Primer auf Kreuzreaktionen mit DNA der jeweils anderen drei Arten getestet wurden.

ZIJLSTRA (1997) beurteilte die Sensitivität der von ihr entwickelten Nachweismethode, indem sie Mischungen von verschiedenen *Meloidogyne*-Arten herstellte. Die einzelnen Spezies waren auch dann noch zu detektieren, wenn ihr Anteil an der Mischung zwischen 2-5 % betrug. Demgegenüber weist die in vorliegender Arbeit entwickelte Methode zur Detektion der beiden Virusüberträger aus der Gattung *Xiphinema* mit 0,125 % (*X. diversicaudatum*) bzw. 0,1 % (*X. index*) eine deutlich höhere Sensitivität auf und das, obwohl im Gegensatz zu den Versuchen mit *Meloidogyne* nur eine sehr geringe Menge (0,5 µl) DNA, gewonnen aus einem einzigen Nematoden, verwendet worden war.

Keiner der zuvor genannten Autoren hat jedoch versucht, die Zielorganismen unter den jeweils im Boden vorkommenden Nematodengemeinschaften nachzuweisen. Als Voraussetzung für die Entwicklung eines Routineverfahrens muss jedoch überprüft werden, ob solche Fremdarten negative Einflüsse auf die Diagnosemethode haben (HÜBSCHEN *et al.*, 2004).

4.4.2 PCR-Bedingungen und Multiplexing

Als sehr vorteilhaft erweist sich die Möglichkeit, alle 10 Primer bei den exakt gleichen Amplifikationsbedingungen einsetzen zu können. Dadurch ist es möglich, die sechs Vektorarten sowie vier weitere Longidoriden gleichzeitig in einem PCR-Lauf nachzuweisen.

Daneben bietet das Multiplexing eine weitere Möglichkeit, Zeit und Geld zu sparen und effektiv zu arbeiten. Dadurch, dass die Primer für die Vektorarten grundsätzlich in Zweiergruppen eingesetzt werden können und auch morphologisch ähnliche Spezies in einem PCR-Ansatz nachweisbar sind, lassen sich die Probenzahl und damit die Kosten reduzieren. Ein weiterer Vorteil ist, dass Mischpopulationen auf diese Art direkt identifiziert werden können. Etwas nachteilig wirkt sich bei dem Primer für *L. attenuatus* die im Vergleich zu den anderen Arten relativ schwache Bande aus. Das erweist sich insbesondere bei längeren Gel-Laufzeiten als Problem, da sich das Ethidiumbromid in die entgegengesetzte Richtung wie die Fragmente bewegt und damit der „untere“ Teil des Geles, in dem die kleinen Produkte zu finden sind, unter Umständen nicht mehr ausreichend gefärbt ist. Auch bei der Multiplex-Verwendung des *L. attenuatus*-Primers ergeben sich oftmals im Vergleich zu dem jeweils anderen Paar schwache Banden. Laut ZIJLSTRA (1997) können verschiedene Bandenstärken beim Multiplex-Einsatz dadurch entstehen, dass die verschiedenen Primer unter den jeweiligen PCR-Bedingungen unterschiedlich gut amplifizieren, auch Sekundär- und Tertiärstrukturen der jeweiligen DNA-Bereiche können eine Rolle für den Anlagerungserfolg spielen.

4.4.3 Möglichkeiten des Praxiseinsatzes und Bewertung der Nachweismethode

Die derzeitigen Anwendungsmöglichkeiten der beschriebenen Nachweismethode dürften vor allen Dingen bei der Klärung von Zweifelsfällen zu finden sein. So können Nematoden, bei denen eine eindeutige Artbestimmung anhand morphologischer Merkmale nicht durchgeführt werden kann, weil beispielweise nur Larvenstadien oder untypisch aussehende Adulte vorliegen, im Anschluss an die mikroskopische Untersuchung in der PCR eingesetzt werden. Da neben der Hitzefixierung auch eine langfristige Aufbewahrung in 1 M NaCl möglich ist, kann während der Arbeitsspitzen anfallendes Material zudem verlustfrei gelagert und zu einem späteren Zeitpunkt weiterverarbeitet werden.

Sofern die einzelnen Verfahrensschritte störungsfrei ablaufen, ist mit Hilfe der beschriebenen Methode eine zuverlässige und sensitive Bestimmung der Virusvektoren im deutschen Weinbau möglich. Voraussetzung ist allerdings, dass in weiteren Herkünften der entsprechenden

Arten keine allzu große Variation im Bereich der Anlagerungsstellen der Primer auftritt, die deren zuverlässiges Arbeiten erschwert oder gar verhindert.

Im Vergleich mit anderen molekularen Diagnoseverfahren im Bereich der Nematologie ist die beschriebene Methode als sehr einfach, schnell und kostengünstig zu bezeichnen und bietet zudem vielversprechende Möglichkeiten zur Weiterentwicklung zu einem Routinetest.

4.5 Ausblick

Die derzeit üblichen Verfahren zur Untersuchung von Bodenproben sind nicht nur sehr arbeitsaufwändig, sondern erfordern auch qualifiziertes und erfahrenes Personal, da die Nematodenbestimmung auf morphologischen Merkmalen beruht (HÜBSCHEN *et al.*, 2002b). Demgegenüber bietet eine auf der PCR basierende Bestimmungsmethode laut FLEMING *et al.* (1998) mehrere Vorteile: es sind keine speziellen taxonomischen Kenntnisse nötig, ein hoher Probendurchsatz ist realisierbar und das Verfahren ist schnell, genau und sensitiv.

Was die in vorliegender Arbeit entwickelte Nachweismethode betrifft, so sind dafür noch einige der arbeitsintensiven Schritte im Vorfeld der Artbestimmung nötig. Für die Praxis der Bodenprobenuntersuchungen wäre es jedoch wünschenswert, möglichst viele davon einzusparen. Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit wurde beobachtet, dass der Besatz mit Fremdnematoden sich scheinbar nicht negativ auf das Nachweisverfahren auswirkt. Das bedeutet, dass eine Vorsortierung der ausgewaschenen Nematoden auf Longidoriden nicht erforderlich ist und die beschriebene Methode damit auch von jemandem ohne nematologische Vorkenntnisse angewandt werden kann. Die Voraussetzungen für eine gemeinsame DNA-Extraktion aller vorhandenen Nematoden sind ebenfalls geschaffen, die Tiere wurden aber bislang noch einzeln ausgelesen. Folglich wäre eine Methode zur Trennung der in der Probe vorhandenen Nematoden von den ebenfalls enthaltenen Bodenpartikeln von Vorteil, da bei Voruntersuchungen im Rahmen dieser Arbeit festgestellt worden war, dass sowohl Bodenpartikel als auch das Probenwasser selbst einen negativen Einfluss auf das Verfahren haben können und eine Detektion enthaltener Longidoriden teilweise unterbinden. Eine weitere Verbesserung im Sinne der Zeitersparnis wäre, wenn das Auswaschen der Bodenproben ganz unterbleiben und beispielsweise, wie bei Bakterien, eine direkte DNA-Extraktion aus dem Boden durchgeführt werden könnte (KÖGLMEIER, 2001). Der Fachhandel bietet dazu bereits spezielle Kits an, die verwendbare Menge an Boden ist jedoch für das hier anfallende Probenausmaß zu stark eingeschränkt.

Die Perspektiven für die Weiterentwicklung des beschriebenen Verfahrens zu einem einfachen Routinetest stellen sich daher als günstig dar. Unabdingbar ist aber, dass die im Rahmen der vorliegenden Arbeit konstruierten Primer mit weiteren Herkünften möglichst aus anderen Ländern getestet werden, um zu überprüfen, ob die zwischen einzelnen Populationen einer Art vorkommenden Unterschiede eine Gefahr für das zuverlässige Arbeiten der Primer darstellen.

Um Fragen der Identifikation zu klären und ein besseres Verständnis von evolutionären bzw. phylogenetischen Beziehungen der Arten zu gewinnen, wird es auch in Zukunft wichtig sein, die zur Verfügung stehenden molekularen und morphologischen Informationen zu verbinden (PERRY und JONES, 1998; COOMANS *et al.*, 2001).

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden das 18S-Gen und die ITS1-Region der rDNA von virusübertragenden Longidoriden und verwandten Nematodenarten untersucht mit dem Ziel, ein molekulares Diagnoseverfahren für die Virusvektoren zu entwickeln und die dabei gewonnenen Sequenzdaten zur Aufklärung von phylogenetischen Beziehungen zu verwenden. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Von 83 Nematodenpopulationen von mindestens 39 verschiedenen Arten aus 19 unterschiedlichen Ländern wurden nahezu vollständige 18S-Sequenzdaten (jeweils rund 1750 bp) gewonnen. 81 der Herkünfte gehören zu den Longidoriden, darunter 50 *Xiphinema* spp., 29 *Longidorus* spp. und 2 *Paralongidorus* spp., und die übrigen beiden gehören zu den Arten *Mononchus aquaticus* aus der Familie der Mononchidae und *Belonolaimus longicaudatus* aus der Familie der Belonolaimidae.
2. Im Bereich des 18S-Genes wurden keine Unterschiede zwischen Populationen einer Art und nur verhältnismäßig wenig Unterschiede zwischen den Spezies innerhalb einer Gattung gefunden. Die Variabilität war in der Regel größer, wenn Arten aus unterschiedlichen Gattungen bzw. unterschiedlichen Familien miteinander verglichen wurden.
3. Bei gleichem Anfangs- und Endpunkt variierte die 18S-Sequenzlänge nur um wenige Basenpaare. Neben hochkonservierten Genbereichen gab es auch solche mit etwas größerer Variabilität. Die am häufigsten vorkommenden Unterschiede zwischen den Sequenzen einzelner Arten waren Basensubstitutionen.
4. Der Vergleich der 18S-Gensequenzen der sechs Virusüberträger im deutschen Weinbau ergab eine Homologie von 93,55 %. Die Länge der Sequenzen variiert bei gleichem Anfangs- und Endpunkt zwischen 1748 bp bei *Paralongidorus maximus* und 1753 bp bei *Xiphinema diversicaudatum* und *X. index*. Die *Longidorus*-Spezies liegen mit 1749 bzw. 1750 bp dazwischen. Bei der Anzahl der einzelnen Nukleotide zeigten sich keine deutlichen Unterschiede zwischen den sechs Arten.
5. Der 18S-Sequenzvergleich zwischen einigen Vektorspezies und morphologisch ähnlichen Arten ergab in zwei der drei untersuchten Kombinationen keine Korrelation zwischen morphologischen und molekularen Unterschieden.
6. Bei der phylogenetischen Analyse der 18S-Daten ergab sich eine getrennte Entwicklungslinie für die *Xiphinema*-Arten, während die *Paralongidorus*-Spezies mit den *Longidorus*-

Arten clusterten. Die Fähigkeit zur Virusübertragung scheint sich mehrere Male unabhängig voneinander entwickelt zu haben.

7. Insgesamt wurden 16 Nematodenpopulationen von 7 verschiedenen Arten - darunter vier Virusvektoren - im Bereich der ITS1-Region sequenziert. Zwischen den Spezies ergaben sich Längenunterschiede hinsichtlich der PCR-Produkte, wobei die Spannweite etwa von 950 bp bis zu 1200 bp reichte.
8. Bei einer Population von *L. helveticus* traten Unterschiede zwischen Individuen auf. Vier der sieben Spezies zeigten Variationen zwischen einzelnen Herkünften. Zwischen den Arten traten ganz erhebliche Sequenzunterschiede in der ITS1-Region auf. Die daraus resultierenden Schwierigkeiten bei der Aneinanderlagerung der Sequenzen führten dazu, dass auf eine phylogenetische Analyse verzichtet wurde.
9. Für die Vektorarten *L. attenuatus*, *L. elongatus*, *L. macrosoma* und *P. maximus*, sowie für *L. helveticus*, *L. profundorum* und *L. sturhani* wurden mit Hilfe der ITS1-Daten spezifische Rückwärts- und mit Hilfe der 18S-Daten ein allgemeiner Vorwärtsprimer konstruiert. Diese Primer wurden zusammen mit den von WANG *et al.* (2003) entwickelten für die Virusüberträger *X. diversicaudatum* und *X. index*, sowie für *X. vuittenezi* praktischen Tests unterworfen.
10. Die Primerkombinationen erwiesen sich für alle 10 Longidoridae-Arten als nachweislicher, spezifisch und sensitiv. Nur das Primerpaar für *X. index* produzierte mit *L. elongatus*-DNA gelegentlich ein unspezifisches PCR-Amplifikat, was jedoch aufgrund seiner Größe und der nur schwachen Bande in der Elektrophorese nicht zu Problemen führt.
11. Alle zehn Primerkombinationen sind bei den exakt gleichen PCR-Bedingungen einsetzbar, was eine Testung auf alle Arten in einem PCR-Lauf erlaubt.
12. In allen Fällen reicht eine einzige Larve zum Nachweis der entsprechenden Art aus. Die Möglichkeiten des Multiplexing erlauben eine effiziente und kostengünstige Probenuntersuchung, sowie eine direkte Detektion von Mischpopulationen.
13. Die Zielorganismen sind auch unter ganzen Nematodengemeinschaften nachweisbar. Eine gemeinsame DNA-Extraktion aller in einer Probe vorkommenden Nematoden ist möglich, ebenso wie der Einsatz von zuvor hitzefixierten Individuen. Eine langfristige Aufbewahrung von Nematoden in 1 M NaCl verringert deren Einsatzfähigkeit in der PCR nicht.

6. Literaturverzeichnis

- Adams, B.J. (1998): Species concepts and the evolutionary paradigm in modern nematology. *Journal of Nematology* **30**: 1-21
- Aleshin, V.V.; Kedrova, O.S.; Milyutina, I.A.; Vladychenskaya, N.S. & N.B. Petrov (1998): Relationships among nematodes based on the analysis of 18S rDNA gene sequences: molecular evidence for monophyly of chromodorian and secernentian nematodes. *Russian Journal of Nematology* **6**: 175-184
- Alfaro, A. & A.C. Goheen (1974): Transmission of strains of grapevine fanleaf virus by *Xiphinema index*. *Plant Disease Reporter* **58**: 549-552
- Andre, H.M.; Ducarme, X.; Anderson, J.M.; Crossley, Jnr. D.A.; Koehler, H.H.; Paoletti, M.G.; Walter, D.E. & P. Lebrun (2001): Skilled eyes are needed to go on studying the richness of the soil. *Nature* **409**: 761
- Andrés, M.F.; Pinochet, J.; Hernández-Dorrego, A. & A. Delibes (2000): Detection and analysis of inter- and intraspecific diversity of *Pratylenchus* spp. using isozyme markers. *Plant Pathology* **49**: 640-649
- Bardonnet, N.; Hans, F.; Serghini, M.A. & L. Pinck (1994): Protection against virus infection in tobacco plants expressing the coat protein of grapevine fanleaf nepovirus. *Plant Cell Reports* **13**: 357-360
- Barsi, L. & F. Lamberti (2000): Morphometric variation and juvenile stages of *Xiphinema vuittenezi* (Nematoda: Dorylaimida) in Serbia. *Nematologia mediterranea* **28**: 3-12
- Beckenbach, K.; Smith, M.J. & J.M. Webster (1992): Taxonomic affinities and intra- and interspecific variation in *Bursaphelenchus* spp. as determined by polymerase chain reaction. *Journal of Nematology* **24**: 140-147
- Behan-Pelletier, V. (1999): Linking soil biodiversity and ecosystem function - the taxonomic dilemma. *BioScience* **99**: 149-153
- Bekal, S.; Gauthier, J.P. & R. Rivoal (1997): Genetic diversity among a complex of cereal cyst nematodes inferred from RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer region. *Genome* **40**: 479-486
- Blaxter, M.L.; De Ley, P.; Garey, J.R.; Liu, L.X.; Scheldeman, P.; Vierstraete, A.; Vanfleteren, J.R.; Mackey, L.Y.; Dorris, M.; Frisse, L.M.; Vida, J.T. & W.K. Thomas (1998): A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* **392**: 71-75
- Bleyer, G. & M. Rüdell (1996): Ist die Nematodenuntersuchung von Rebschulböden erforderlich? Untersuchungsergebnisse aus Baden-Württemberg und Rheinland-Pfalz. *Deutsches Weinbau-Jahrbuch* **47**: 85-94
- Blok, V.C.; Malloch, G.; Harrower, B.; Phillips, M.S. & T.C. Vrain (1998): Intraspecific variation in ribosomal DNA in populations of the potato cyst nematode *Globodera pallida*. *Journal of Nematology* **30**: 262-274

- Boag, B.; Brown, D.J.F. & P.B. Topham (1987): Vertical and horizontal distribution of virus-vector nematodes and implications for sampling procedures. *Nematologica* **33**: 83-96
- Boag, B.; Raschke, I.E. & D.J.F. Brown (1977): Observations on the life cycle and pathogenicity of *Paralongidorus maximus* in a forest nursery in Scotland. *Annals of Applied Biology* **85**: 389-397
- Bouquet, A. (1981): Resistance to grape fanleaf virus in muscadine grape inoculated with *Xiphinema index*. *Plant Disease* **65**: 791-793
- Boutsika, K. (2002): Molecular identification and phylogenies of virus and non-virus vector Trichodorid nematodes. Dissertation University of Dundee. 330 S.
- Brown, D.J.F. (1981): The effect of operator and measuring system error on the morphometrical variability of one nematode specimen. *Revue de Nématologie* **4**: 169-171
- Brown, D.J.F. (1985a): The effect, after four years, of a change in biotope on the morphometrics of populations of *Xiphinema diversicaudatum* (Nematoda: Dorylaimoidea). *Nematologia mediterranea* **13**: 7-13
- Brown, D.J.F. (1985b): The transmission of two strains of strawberry latent ringspot virus by populations of *Xiphinema diversicaudatum* (Nematoda: Dorylaimoidea). *Nematologia mediterranea* **13**: 217-223
- Brown, D.J.F. (1986): The transmission of two strains of arabis mosaic virus from England by populations of *Xiphinema diversicaudatum* (Nematoda: Dorylaimoidea) from ten countries. *Revue de Nématologie* **9**: 83-87
- Brown, D.J.F. & B. Boag (1975): *Longidorus macrosoma*. C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes. Set 5, No. 67, 4pp.
- Brown, D.J.F. & B. Boag (1977): *Longidorus attenuatus*. C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes. Set 7, No. 101, 4pp.
- Brown, D.J.F. & M.I. Coiro (1983): The total reproductive capacity and longevity of individual female *Xiphinema diversicaudatum* (Nematoda: Dorylaimida). *Nematologia mediterranea* **11**: 87-92
- Brown, D.J.F. & M.I. Coiro (1985): The reproductive capacity and longevity of *Xiphinema index* (Nematoda: Dorylaimida) from three populations on selected host plants. *Revue de Nématologie* **8**: 171-173
- Brown, D.J.F. & C.E. Taylor (1987): Comments on the occurrence and geographical distribution of longidorid nematodes in Europe and the Mediterranean region. *Nematologia mediterranea* **15**: 333-373
- Brown, D.J.F. & P.B. Topham (1985): Morphometric variability between populations of *Xiphinema diversicaudatum* (Nematoda: Dorylaimoidea). *Revue de Nématologie* **8**: 15-26

- Brown, D.J.F. & D.L. Trudgill (1983): Differential transmissibility of arabis mosaic and strains of strawberry latent ringspot viruses by three populations of *Xiphinema diversicaudatum* (Nematoda: Dorylaimida) from Scotland, Italy and France. *Revue de Nématologie* **6**: 229-238
- Brown, D.J.F. & D.L. Trudgill (1997): Longidorid nematodes and their associated viruses. in: An introduction to virus vector nematodes and their associated viruses. Edited by M.S.N. de A. Santos, I.M. de O. Abrantes, D.J.F. Brown & R.M. Lemos (1997), Instituto do Ambiente e Vida (IAV): 1-40
- Brown, D.J.F.; Murant, A.F. & D.L. Trudgill (1989): Differences between isolates of the English serotype of tomato black ring virus in their transmissibility by an English population of *Longidorus attenuatus* (Nematoda: Dorylaimoidea). *Revue de Nématologie* **12**: 51-56
- Brown, D.J.F.; Halbrendt, J.M.; Robbins, R.T. & T.C. Vrain (1993): Transmission of nepoviruses by *Xiphinema americanum*-group nematodes. *Journal of Nematology* **25**: 349-354
- Cadman, C.H. (1963): Biology of soil-borne viruses. *Annual Review of Phytopathology* **1**: 143-172
- Cherry, T.; Szalanski, A.L.; Todd, T.C. & T.O. Powers (1997): The internal transcribed spacer region of *Belonolaimus* (Nemata: Belonolaimidae). *Journal of Nematology* **29**: 23-29
- Cho, M.R. & R.T. Robbins (1991): Morphological variation among 23 *Xiphinema americanum* populations. *Journal of Nematology* **23**: 134-144
- Cohn, E. (1970): Observations on the feeding and symptomatology of *Xiphinema* and *Longidorus* on selected host roots. *Journal of Nematology* **2**: 167-173
- Cohn, E. & M. Mordechai (1969): Investigations on the life cycles and host preference of some species of *Xiphinema* and *Longidorus* under controlled conditions. *Nematologica* **15**: 295-302
- Cohn, E. & S.A. Sher (1972): A contribution to the taxonomy of the genus *Xiphinema* Cobb, 1913. *Journal of Nematology* **4**: 36-65
- Coiro, M.I. & A. Agostinelli (1991): The development of juvenile stages of *Xiphinema index* (Nematoda: Dorylaimida) on *Vitis vinifera*. *Revue de Nématologie* **14**: 181-182
- Coiro, M.I. & D.J.F. Brown (1984): The status of some plants as hosts for four populations of *Xiphinema index* (Nematoda: Dorylaimida). *Revue de Nématologie* **7**: 283-286
- Coiro, M.I.; Brown, D.J.F. & F. Lamberti (1990a): Reproduction of *Xiphinema index* (Nematoda: Dorylaimida) on five plant species. *Nematologica* **36**: 474-478
- Coiro, M.I.; Serino, M. & A. Agostinelli (1991): Feeding and reproduction of *Xiphinema index* (Nematoda: Dorylaimida) on two hosts at three temperatures. *Nematologia mediterranea* **19**: 101-102

- Coiro, M.I.; Taylor, C.E. & F. Lamberti (1990b): Reproduction of two populations of *Xiphinema index* in relation to host and temperature. *Nematologia mediterranea* **18**: 117-118
- Coiro, M.I.; Taylor, C.E.; Borgo, M. & F. Lamberti (1990c): Resistance of grapevine rootstocks to *Xiphinema index*. *Nematologia mediterranea* **18**: 119-121
- Coiro, M.I.; Lamberti, F.; Sabová, M.; Sasanelli, N.; Agostinelli, A. & B. Valocká (2000): The life cycle of *Xiphinema vuittenezi* (Nematoda) from Slovakia. *Nematologia mediterranea* **28**: 27-30
- Coomans, A. (1996): Phylogeny of the Longidoridae. *Russian Journal of Nematology* **4**: 51-60
- Coomans, A. & E. Chaves (1995): *Paraxiphidorus michelluci* n.g., n.sp. from Argentina (Nematoda: Longidoridae). *Fundamental and Applied Nematology* **18**: 303-306
- Coomans, A.; Huys, R.; Heyns, J. & M. Luc (2001): Character analysis, phylogeny and biogeography of the genus *Xiphinema* Cobb, 1913 (Nematoda: Longidoridae). *Musée Royale De L'Afrique Centrale, Tervuren, Belgique. Annales Sciences Zoologique* **287**, 239 S.
- Cotten, J. (1976): Observations of life-cycle, population development and vertical distribution of *Longidorus macrosoma* on raspberry and other crops. *Annals of Applied Biology* **83**: 407-412
- Das, S. & D.J. Raski (1968): Vector-efficiency of *Xiphinema index* in the transmission of grapevine fanleaf virus. *Nematologica* **14**: 55-62
- Debrot, E.A. (1964): Studies on a strain of raspberry ringspot virus occurring in England. *Annals of Applied Biology* **54**: 183-191
- Dechet, F. (1991): Untersuchungen zur Wirkung von Pflanzen und Pflanzeninhaltsstoffen auf *Xiphinema index* Thorne & Allen 1950 (Nematoda: Dorylaimida). Dissertation Universität Kaiserslautern, 118 S.
- De Giorgi, C.; De Luca, F.; Veronico, P.; Cortese, M.R.; Di Vito, M. & F. Lamberti (1999): Application of molecular biology in plant nematology. *Helminthologia* **36**: 171-173
- De Giorgi, C.; Finetti Sialer, M.; Di Vito, M. & F. Lamberti (1992): A fragment of the large subunit of the rRNA gene amplified by polymerase chain reaction in individual nematodes. *Nematologia mediterranea* **20**: 149-152
- De Ley, I. T.; De Ley, P.; Vierstraete, A.; Karssen, G.; Moens, M. & J. Vanfleteren (2002): Phylogenetic analyses of *Meloidogyne* small subunit rDNA. *Journal of Nematology* **34**: 319-327
- De Ley, P.; De Ley, I.T.; Vierstraete, A.; Vanfleteren, J.; Blaxter, M. & A. Coomans (1997): Nematode 18S rRNA sequence data and the classification of plant parasites. *Journal of Nematology* **29**: 575

- Di Vito, M.; Rohini, H.M.; Ekanayake, K. & V. Savino (1985): The effect of initial population densities of *Xiphinema index* on the growth of grapevine. *Nematologia mediterranea* **13**: 185-189
- Dorris, M.; De Ley, P. & M.L. Blaxter (1999): Molecular analysis of nematode diversity and the evolution of parasitism. *Parasitology Today* **15**: 188-193
- Dover, G. (1982): Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature* **299**: 111-117
- Dover, G.A. (1988): rDNA world falling to pieces. *Nature* **336**: 623-624
- Dover, G.A. (1989): Linkage disequilibrium and molecular drive in the rDNA gene family. *Genetics* **122**: 249-252
- Duncan, L.W.; Inserra, R.N.; Thomas, W.K.; Dunn, D.; Mustika, I.; Frisse, L.M.; Mendes, M.L.; Morris, K. & D.T. Kaplan (1999): Molecular and morphological analysis of isolates of *Pratylenchus coffeae* and closely related species. *Nematropica* **29**: 61-80
- Ellis, R.E.; Sulston, J.E. & A.R. Coulson (1986): The rDNA of *C. elegans*: sequence and structure. *Nucleic Acids Research* **14**: 2345-2364
- Fallas, G.A.; Hahn, M.L.; Fargette, M.; Burrows, P.R. & J.L. Sarah (1996): Molecular and biochemical diversity among isolates of *Radopholus spp.* from different areas of the world. *Journal of Nematology* **28**: 422-430
- Feil, H.; Westerdahl, B.B.; Smith, R.J. & P. Verdegaal (1997): Effects of seasonal and site factors on *Xiphinema index* populations in two California vineyards. *Journal of Nematology* **29**: 491-500
- Felsenstein, J. (1985): Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791
- Fenton, B.; Malloch, G. & F. Germa (1998): A study of variation in rDNA ITS region shows that two haplotypes coexist within a single aphid genome. *Genome* **41**: 337-345
- Ferris, V.R. (1983): Phylogeny, historical biogeography and the species concept in soil nematodes. in: Concepts in nematode systematics, ed. by Stone, A.R.; Platt, H.M. & L.F. Khadil. The Systematics Association Special Volume No. 22: 143-161, Academic Press
- Ferris, V.R.; Ferris, J.M. & J. Faghihi (1993): Variation in spacer ribosomal DNA in some cyst-forming species of plant parasitic nematodes. *Fundamental and Applied Nematology* **16**: 177-184
- Ferris, V.R.; Ferris, J.M.; Faghihi, J. & A. Ireholm (1994): Comparisons of isolates of *Heterodera avenae* using 2-D PAGE protein patterns and ribosomal DNA. *Journal of Nematology* **26**: 144-151
- Ferris, V.R.; Krall, E.; Faghihi, J. & J.M. Ferris (1999a): Phylogenetic relationships of *Globodera millefolii*, *G. artemisiae*, and *Cactodera salina* based on ITS region of ribosomal DNA. *Journal of Nematology* **31**: 498-507

- Ferris, V.R.; Miller, L.I.; Faghihi, J. & J.M. Ferris (1995): Ribosomal DNA comparisons of *Globodera* from two continents. *Journal of Nematology* **27**: 273-283
- Files, J.G. & D. Hirsh (1981): Ribosomal DNA of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Molecular Biology* **149**: 223-240
- Fitch, W.M. & E. Margoliash (1967): Construction of phylogenetic trees. *Science* **155**: 279-284
- Fitch, D.H.A.; Bugaj-Gaweda, B. & S.W. Emmons (1995): 18S ribosomal rRNA gene phylogeny for some Rhabditidae related to *Caenorhabditis*. *Molecular Biology and Evolution* **12**: 346-358
- Flegg, J.J.M. (1968a): The occurrence and depth distribution of *Xiphinema* and *Longidorus* species in southeastern England. *Nematologica* **14**: 189-196
- Flegg, J.J.M. (1968b): Life-cycle studies of some *Xiphinema* and *Longidorus* species in southeastern England. *Nematologica* **14**: 197-210
- Fleming, C.C.; Turner, S.J.; Powers, T.O. & A.L. Szalanski (1998): Diagnostics of cyst nematodes: use of the polymerase chain reaction to determine species and estimate population levels. *Aspects of Applied Biology* **52**: 375-382
- Floyd, R.; Abebe, E.; Papert, A. & M. Blaxter (2002): Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular Ecology* **11**: 839-850
- Forghani, B.; Sanger, H.L. & F. Grossmann (1965): Ubertragung des Tomaten-Schwarzringflecken-Virus an Okurbis durch *Longidorus attenuatus* Hooper in Deutschland. *Nematologica* **11**: 450-451
- Foucher, A. & M. Wilson (2002): Development of a polymerase chain reaction-based denaturing gradient gel electrophoresis technique to study nematode species biodiversity using the 18S rDNA gene. *Molecular Ecology Notes* **2**: 45-48
- Frederick, J.J. & A.C. Tarjan (1978): Variability in measurements made of same nematode specimen by various observers or by one observer on different days. *Nematologica* **24**: 476-478
- Fritzsche, R. & H. Kegler (1968): Nematoden als Vektoren von Viruskrankheiten der Obstgewachse. Tagungsberichte, Deutsche Akademie der Landwirtschaftswissenschaften, Berlin **97**: 289-295
- Gasser, R.B.; Monti, J.R.; Zhu, X.; Chilton, N.B.; Hung, G.-C. & P. Guldberg (1997): Polymerase chain reaction-linked single-strand conformation polymorphism of ribosomal DNA to fingerprint parasites. *Electrophoresis* **18**: 1564-1566
- Georgi, L.L. & A.G. Abbott (1998): Variation in ribosomal genes in *Meloidogyne arenaria*. *Fundamental and Applied Nematology* **21**: 685-694

- Giribet, G. & C. Ribera (2000): A review of Arthropod phylogeny: new data based on ribosomal DNA sequences and direct character optimization. *Cladistics* **16**: 204-231
- Griffiths, B.S. & D.L. Trudgill (1983): A comparison of the generation times of and gall formation by *Xiphinema diversicaudatum* and *Longidorus elongatus* on a good and a poor host. *Nematologica* **29**: 78-87
- Halbrendt, J.M. & D.J.F. Brown (1992): Morphometric evidence for three juvenile stages in some species of *Xiphinema americanum* sensu lato. *Journal of Nematology* **24**: 305-309
- Halbrendt, J.M. & D.J.F. Brown (1993): Aspects of biology and development of *Xiphinema americanum* and related species. *Journal of Nematology* **25**: 355-360
- Halbrendt, J.M. & D.J.F. Brown (1994): Inter- and intraspecific variation in wild-type and single female-derived populations of *Xiphinema americanum*-group nematodes. *Journal of Nematology* **26**: 212-221
- Harrison, B.D. (1964): Specific nematode vectors for serologically distinctive forms of raspberry ringspot and tomato black ring viruses. *Virology* **22**: 544-550
- Harrison, B.D. (1967): The transmission of strawberry latent ringspot virus by *Xiphinema diversicaudatum* (Nematoda). *Annals of Applied Biology* **60**: 405-409
- Harrison, B.D. & C.H. Cadman (1959): Role of a dagger nematode (*Xiphinema* sp.) in outbreaks of plant diseases caused by arabis mosaic virus. *Nature* **184**: 1624-1626
- Harrison, B.D. & R.D. Winslow (1961): Laboratory and field studies on the relation of arabis mosaic virus to its nematode vector *Xiphinema diversicaudatum* (Micoletzky). *Annals of Applied Biology* **49**: 621-633
- Harrison, B.D.; Mowat, W.P. & C.E. Taylor (1961): Transmission of a strain of tomato black ring virus by *Longidorus elongatus* (Nematoda). *Virology* **14**: 480-485
- Hewitt, W.B.; Raski, D.J. & A.C. Goheen (1958): Nematode vector of soil-borne fanleaf virus of grapevines. *Phytopathology* **48**: 586-595
- Heyns, J. (1975): *Paralongidorus maximus*. C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes. Set 5, No. 75, 4pp.
- Hillis, D.M.; Moritz, C.; Porter, C.A. & R.J. Baker (1991): Evidence for biased gene conversion in concerted evolution of ribosomal DNA. *Science* **251**: 308-310
- Hooper, D.J. (1961): A redescription of *Longidorus elongatus* (de Man, 1876) Thorne & Swanger, 1936, (Nematoda, Dorylaimidae) and descriptions of five new species of *Longidorus* from Great Britain. *Nematologica* **6**: 237-257
- Hooper, D.J. (1973): *Longidorus elongatus*. C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes. Set 2, No. 30, 4pp.

- Hooper, D.J. & J.F. Southey (1973): The Longidoridae. Association of Applied Biologists, Nematology Group, „ The Identification and Biology of *Longidorus*, *Paralongidorus* and *Xiphinema* species found in the British Isles with observations on the oesophageal ultra-structure of some species.“. Harpenden: Rothamsted Experimental Station, UK: 3-10
- Hoyer, U.; Burgermeister, W. & H. Braasch (1998): Identification of *Bursaphelenchus* species (Nematoda, Aphelenchoididae) on the basis of amplified ribosomal DNA (ITS-RFLP). *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* **50**: 273-277
- Hübschen, J.; Neilson, R.; Ipach, U. & D.J.F. Brown (2002a): Phylogenetic relationships based on 18S sequences among some *Xiphinema* species with three and four juvenile developmental stages. *Nematology* **4**: 170
- Hübschen, J.; Ipach, U.; Zinkernagel, V.; Esmenjaud, D.; Brown, D.J. F. & R. Neilson (2002b): Molecular diagnostics for virus-transmitting nematodes in German viticulture. *Nematology* **4**: 170-171
- Hübschen, J.; Kling, L.; Ipach, U.; Zinkernagel, V.; Bosselut, N.; Esmenjaud, D.; Brown, D.J.F. & R. Neilson (2004): Validation of the specificity and sensitivity of species-specific primers that provide a robust and reliable molecular diagnostic for *Xiphinema diversicaudatum*, *X. index* and *X. vuittenezi*. *European Journal of Plant Pathology*, in Druck.
- Hübschen, J.; Oliveira, M.; Auwerkerken, A.; Barsi, L.; Ferraz, L.; Ipach, U.; Lazarova, S.; Liskova, M.; Peneva, V.; Robbins, R.; Susulowsky, A.; Tzortzakais, M.; Ye, W.; Zheng, J.; Neilson, R. & D.J.F. Brown (2002c): A phylogeny of selected *Longidoridae* based on 18S rDNA gene sequences. *Nematology* **4**: 170
- Huelsenbeck, J.P. (1995): Performance of phylogenetic methods in simulation. *Systematic Biology* **44**: 17-48
- Hunt, D.J. (1993): Aphelenchida, Longidoridae and Trichodoridae: Their systematics and bionomics. CAB International, Wallingford, UK, 352 S.
- Ibrahim, S.K.; Perry, R.N.; Burrows, P.R. & D.J. Hooper (1994): Differentiation of species and populations of *Aphelenchoides* and of *Ditylenchus angustus* using a fragment of ribosomal DNA. *Journal of Nematology* **26**: 412-421
- Iwahori, H.; Tsuda, K.; Kanzaki, N.; Izui, K. & K. Futai (1998): PCR-RFLP and sequencing analysis of ribosomal DNA of *Bursaphelenchus* nematodes related to pine wilt disease. *Fundamental and Applied Nematology* **21**: 655-666
- Jha, A. & A.F. Posnette (1959): Transmission of a virus to strawberry plants by a nematode (*Xiphinema sp.*). *Nature* **184**: 962-963
- Jones, A.T.; Brown, D.J.F.; McGavin, W.J.; Rüdell, M. & B. Altmayer (1994): Properties of an unusual isolate of raspberry ringspot virus from grapevine in Germany and evidence for its possible transmission by *Paralongidorus maximus*. *Annals of Applied Biology* **124**: 283-300

- Jones, J.T.; Phillips, M.S. & M.R. Armstrong (1997): Molecular approaches in plant nematology. *Fundamental and Applied Nematology* **20**: 1-14
- Kanzaki, N. & K. Futai (2002): A PCR primer set for determination of phylogenetic relationships of *Bursaphelenchus* species within the *xylophilus* group. *Nematology* **4**: 35-41
- Kaplan, D.T.; Thomas, W.K.; Frisse, L.M.; Sarah, J.L.; Stanton, J.M.; Speijer, P.R.; Marin, D.H. & C.H. Opperman (2000): Phylogenetic analysis of geographically diverse *Radopholus similis* via rDNA sequence reveals a monomorphic motif. *Journal of Nematology* **32**: 134-142
- Kerry, B.R. & S.R. Gowen (1995): Biological control of plant parasitic nematodes. *Nematologica* **41**: 362-363
- Kirkpatrick, J.D.; Van Gundy, S.D. & J.P. Martin (1965): Effects of *Xiphinema index* on growth and abscission in Carignane grape, *Vitis vinifera*. *Nematologica* **11**: 41
- Knoetze, R.; Burger, J.T. & A.J. Meyer (2003): Discrimination of some *Xiphinema* species from South Africa by rDNA-RFLP analysis. *Nematological Abstracts* **72**: 65
- Kocher, T.D. & A.C. Wilson (1991): Sequence evolution of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees: Control region and a protein-coding region. in: *Evolution of life*. Edited by Osawa, S. & T. Honjo. Springer-Verlag, New York: 391-413
- Köglmeier, W. (2001): Untersuchung bakterieller Gemeinschaften in Weinbergböden durch Analyse von 16S rDNA-Fragmenten unter Verwendung Denaturierender Gradientengel-Elektrophorese (DGGE). Dissertation Universität Konstanz. 94 S.
- Lamberti, F. & A. Ciancio (1993): Diversity of *Xiphinema americanum*-group species and hierarchical cluster analysis of morphometrics. *Journal of Nematology* **25**: 332-343
- Lamberti, F. & T. Bleve-Zacheo (1979): Studies on *Xiphinema americanum sensu lato* with descriptions of fifteen new species (Nematoda, Longidoridae). *Nematologia mediterranea* **7**: 51-106
- Lamberti, F.; Molinari, S.; Moens, M. & D.J.F. Brown (2000): The *Xiphinema americanum* group. I. Putative species, their geographical occurrence and distribution, and regional polytomous identification keys for the group. *Russian Journal of Nematology* **8**: 65-84
- Lamberti, F.; Kunz, P.; Grunder, J.; Molinari, S.; De Luca, F.; Agostinelli, A. & V. Radicci (2001): Molecular characterisation of six *Longidorus* species from Switzerland with the description of *Longidorus helveticus* sp.n. (Nematoda, Dorylaimida). *Nematologia mediterranea* **29**, 181-205
- Lamberti, F.; Sabová, M.; De Luca, F.; Molinari, S.; Agostinelli, A.; Coiro, M.I. & B. Valocká (1999): Phenotypic variations and genetic characterization of *Xiphinema* populations from Slovakia (Nematoda: Dorylaimida). *Nematologia mediterranea* **27**: 261-275
- Liao, J.L.; Zhang, L.H. & Z.X. Feng (2001): Reliable identification of *Bursaphelenchus xylophilus* by rDNA amplification. *Nematologia mediterranea* **29**: 131-135

- Lister, R.M. (1964): Strawberry latent ringspot: a new nematode-borne virus. *Annals of Applied Biology* **54**: 167-176
- Lister, R.M. & A.F. Murant (1967): Seed-transmission of nematode-borne viruses. *Annals of Applied Biology* **59**: 49-62
- Luc, M. & E. Cohn (1982): The male of *Xiphinema index* Thorne & Allen, 1950 (Nematoda: Longidoridae). *Revue de Nématologie* **5**: 211-215
- Luc, M.; Lima, M.B.; Weischer, B. & J.J.M. Flegg (1964): *Xiphinema vuittenezi* n. sp. (Nematoda: Dorylaimidae). *Nematologica* **10**: 151-163
- Maniatis, T.; Fritsch, E.F. & J. Sambrook (1982): Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 545 S.
- Martelli, G.P. (1978): Nematode-borne viruses of grapevine, their epidemiology and control. *Nematologia mediterranea* **6**: 1-27
- McElroy, F.D.; Brown, D.J.F. & B. Boag (1977): The virus-vector and damage potential, morphometrics and distribution of *Paralongidorus maximus*. *Journal of Nematology* **9**: 122-130
- McNamara, D.G. (1980): The survival of *Xiphinema diversicaudatum* in plant-free soil. *Nematologica* **26**: 170-181
- Mitkowski, N.A.; Van der Beek, J.G. & G.S. Abawi (2002): Characterization of root-knot nematode populations associated with vegetables in New York State. *Plant Disease* **86**: 840-847
- Molinari, S.; De Luca, F.; Lamberti, F. & C. De Giorgi (1997): Molecular methods for the identification of Longidorid nematodes. *Nematologia mediterranea* **25**: 55-61
- Nadler, S.A. (1995): Advantages and disadvantages of molecular phylogenetics: a case study of ascaridoid nematodes. *Journal of Nematology* **27**: 423-432
- Nadler, S.A. (2002): Species delimitation and nematode biodiversity: phylogenies rule. *Nematology* **4**: 615-625
- Nasmith, C.G.; Speranzini, D.; Jeng, R. & M. Hubbes (1996): RFLP analysis of PCR amplified ITS and 26S ribosomal RNA genes of selected entomopathogenic nematodes (Steinernematidae, Heterorhabditidae). *Journal of Nematology* **28**: 15-25
- Neilson, R.; Ye, W.; Oliveira, C.M.G.; Hübschen, J.; Robbins, R.T.; Brown, D.J.F. & A.L. Szalanski (2004): Phylogenetic relationships of selected species of Longidoridae (Nematoda: Longidoridae) from North America inferred from 18S rDNA gene sequence data. *Genome*, eingereicht.
- Nguyen, K.B.; Maruniak, J. & B.J. Adams (2001): Diagnostic and phylogenetic utility of the rDNA internal transcribed spacer sequences of *Steinernema*. *Journal of Nematology* **33**: 73-82

- Noller, H.F. (1984): Structure of ribosomal RNA. *Annual Review of Biochemistry* **53**: 119-162
- Oliveira, C.M.G.; Hübschen, J.; Brown, D.J.F.; Ferraz, L.C.C.B.; Wright, F. & R. Neilson (2004): Phylogenetic relationships among *Xiphinema* and *Xiphidorus* nematode species from Brazil inferred from 18S rDNA gene sequences. *Journal of Nematology*, in Druck.
- Perry, R.N. & J.T. Jones (1998): The use of molecular biology techniques in plant nematology: past, present and future. *Russian Journal of Nematology* **6**: 47-56
- Philis, J. (1994): Cultural practices for the control of *Xiphinema index* in Cyprus. *Nematologia mediterranea* **22**: 125-126
- Pitcher, R.S.; Siddiqi, M.R. & D.J.F. Brown (1974): *Xiphinema diversicaudatum*. C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes. Set 4, No. 60, 4pp.
- Powers, T.O.; Szalanski, A.L.; Mullin, P.G.; Harris, T.S.; Bertozzi, T. & J.A. Griesbach (2001): Identification of seed gall nematodes of agronomic and regulatory concern with PCR-RFLP of ITS1. *Journal of Nematology* **33**: 191-194
- Powers, T.O.; Todd, T.C.; Burnell, A.M.; Murray, P.C.B.; Fleming, C.C.; Szalanski, A.L.; Adams, B.A. & T.S. Harris (1997): The rDNA internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. *Journal of Nematology* **29**: 441-450
- Radewald, J.D. & D.J. Raski (1962a): A study of the life cycle of *Xiphinema index*. *Phytopathology* **52**: 748
- Radewald, J.D. & D.J. Raski (1962b): Studies on the host range and pathogenicity of *Xiphinema index*. *Phytopathology* **52**: 748-749
- Raski, D.J.; Goheen, A.C.; Lider, L.A. & C.P. Meredith (1983): Strategies against *grapevine fanleaf virus* and its nematode vector. *Plant Disease* **67**: 335-339
- Raski, D.J.; Hewitt, W.B.; Goheen, A.C.; Taylor, C.E. & R.H. Taylor (1965): Survival of *Xiphinema index* and reservoirs of fanleaf virus in fallowed vineyard soil. *Nematologica* **11**: 349-352
- Robbins, R.T.; Brown, D.J.F.; Halbrecht, J.M. & T.C. Vrain (1995): Compendium of *Longidorus* juvenile stages with observations on *L. pisi*, *L. taniwha* and *L. diadecturus* (Nematoda: Longidoridae). *Systematic Parasitology* **32**: 33-52
- Robbins, R.T.; Brown, D.J.F.; Halbrecht, J.M. & T.C. Vrain (1996): Compendium of juvenile stages of *Xiphinema* species (Nematoda: Longidoridae). *Russian Journal of Nematology* **4**: 163-171
- Rubtsova, T.V.; Subbotin, S.A.; Brown, D.J.F. & M. Moens (2001): Description of *Longidorus sturhani* sp. n. (Nematoda: Longidoridae) and molecular characterisation of several longidorid species from Western Europe. *Russian Journal of Nematology* **9**: 127-136

- Rüdel, M. (1977): Übertragung des Tomatenschwarzringflecken-Virus (tomato black ring virus) durch den Nematoden *Longidorus attenuatus* (Nematoda) auf Reben und andere Pflanzenarten. *Wein-Wissenschaft* **32**: 11-24
- Rüdel, M. (1971): Vorkommen einiger Arten der Gattung *Xiphinema* (Nematoda: Dorylaimidae) in Pfalz und Rheinhessen. *Weinberg und Keller* **18**: 505-520
- Rüdel, M. (1975): Schadnematoden im Weinbau. *Deutsches Weinbau Jahrbuch 1975*: 159-165
- Rüdel, M. (1978): Übertragung des Arabis-Mosaik-Virus (AMV) durch den Nematoden *Xiphinema diversicaudatum* (Micoletzki) Thorne auf Rebensämlinge. *Wein-Wissenschaft* **33**: 243-247
- Rüdel, M. (1980): *Xiphinema vuittenezi* (Nematoda: Dorylaimidae) – Virusüberträger bei Reben? *Wein-Wissenschaft* **35**: 177-194
- Rüdel, M. (1985): Grapevine damage induced by particular virus-vector combinations. *Phytopathologia mediterranea* **24**: 183-185
- Rüdel, M. (1987): Nematizideinsatz in Junganlagen. *Weinwirtschaft* **4**: 37
- Rüdel, M. (1988): Bekämpfung virusübertragender Nematoden. *Weinwirtschaft* **3**: 19-21
- Rüdel, M. (1990): Nematode transmitted virus diseases of grapevine in the Palatinate, Germany. *Nematologica* **36**: 388-389
- Sabo, A.; Vovlas, N. & V.R. Ferris (2001): Phylogenetic relationships based on ribosomal DNA data for four species of cyst nematodes from Italy and one from Syria. *Journal of Nematology* **33**: 183-190
- Schaaf, C. (1999): Untersuchungen zur Wirkung von Pflanzeninhaltsstoffen und Feindpflanzen auf die phytoparasitären Nematoden *Xiphinema index* Thorne & Allen 1950 und *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White 1919) Chitwood 1949. Dissertation Universität Hohenheim. 153 S.
- Shurtleff, M.C. & C.W. Averre III (2000): Diagnosing plant diseases caused by nematodes. APS Press, St. Paul, Minnesota, 187 S.
- Siddiqi, M.R. (1974): *Xiphinema index*. C.I.H. Descriptions of plant-parasitic nematodes. Set 3, No. 45, 4pp.
- Siddiqi, M.R.; Hooper, D.J. & E. Khan (1963): A new nematode genus *Paralongidorus* (Nematoda: Dorylaimoidea) with descriptions of two new species and observations on *Paralongidorus citri* (Siddiqi 1959) n. comb. *Nematologica* **9** : 7-14
- Stanton, J.M.; McNicol, C.D. & V. Steele (1998): Non-manual lysis of second-stage *Meloidogyne* juveniles for identification of pure and mixed samples based on the polymerase chain reaction. *Australasian Plant Pathology* **27**: 112-115

- Staudt, G. & B. Weischer (1992): Resistance to transmission of *grapevine fanleaf virus* by *Xiphinema index* in *Vitis rotundifolia* and *Vitis munsoniana*. *Die Wein-Wissenschaft* **47**: 56-61
- Sturhan, D. (1964): Der Nematode *Longidorus maximus* als Schädling in Rebschulen. *Weinberg und Keller* **11**: 293-300
- Subbotin, S.A.; Halford, P.D.; Warry, A. & R.N. Perry (2000): Variations in ribosomal DNA sequences and phylogeny of *Globodera* parasitising solanaceous plants. *Nematology* **2**: 591-604
- Sultan, S.A. & H. Ferris (1991): The effect of soil moisture and soil particle size on the survival and population increase of *Xiphinema index*. *Revue de Nématologie* **14**: 345-351
- Szalanski, A.L.; Sui, D.D.; Harris, T.S. & T.O. Powers (1997): Identification of cyst nematodes of agronomic and regulatory concern with PCR-RFLP of ITS1. *Journal of Nematology* **29**: 255-267
- Taylor, C.E. (1962): Transmission of raspberry ringspot virus by *Longidorus elongatus* (de Man) (Nematoda: Dorylaimidae). *Virology* **17**: 493-494
- Taylor, C.E. (1967): The multiplication of *Longidorus elongatus* (de Man) on different host plants with reference to virus transmission. *Annals of Applied Biology* **59**: 275-281
- Taylor, C.E. & D.J.F. Brown (1997): Nematode vectors of plant viruses. CAB International, Wallingford, UK, 286 S.
- Taylor, C.E. & D.J. Raski (1964): On the transmission of grape fanleaf by *Xiphinema index*. *Nematologica* **10**: 489-495
- Taylor, C.E. & P.R. Thomas (1968): The association of *Xiphinema diversicaudatum* (Micoletsky) with strawberry latent ringspot and arabis mosaic viruses in a raspberry plantation. *Annals of Applied Biology* **62**: 147-157
- Taylor, C.E.; Brown, D.J.F.; Neilson, R. & A.T. Jones (1994): The persistence and spread of *Xiphinema diversicaudatum* in cultivated and uncultivated biotopes. *Annals of Applied Biology* **124**: 469-477
- Thiéry, M. & D. Mugniéry (1996): Interspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in *Globodera* species, parasites of Solanaceous plants. *Fundamental and Applied Nematology* **19**: 471-479
- Thomas, P.R. (1969): Population development of *Longidorus elongatus* on strawberry in Scotland with observations on *Xiphinema diversicaudatum* on raspberry. *Nematologica* **15**: 582-590
- Thomas, P.R. (1970): Host status of some plants for *Xiphinema diversicaudatum* (Micol.) and their susceptibility to viruses transmitted by this species. *Annals of Applied Biology* **65**: 169-178

- Thomas, P.R. (1981): Migration of *Longidorus elongatus*, *Xiphinema diversicaudatum* and *Ditylenchus dipsaci* in soil. *Nematologia mediterranea* **9**: 75-81
- Trudgill, D.L. & D.J.F. Brown (1978): Ingestion, retention, and transmission of two strains of raspberry ringspot virus by *Longidorus macrosoma*. *Journal of Nematology* **10**: 85-89
- Trudgill, D.L.; Brown, D.J.F. & D.G. McNamara (1983): Methods and criteria for assessing the transmission of plant viruses by longidorid nematodes. *Revue de Nématologie* **6**: 133-141
- Trudgill, D.L.; Brown, D.J.F. & W.M. Robertson (1981): A comparison of the effectiveness of the four British virus vector species of *Longidorus* and *Xiphinema*. *Annals of Applied Biology* **99**: 63-70
- Trudgill, D.L.; Robertson, W.M. & U. Wyss (1991): Analysis of the feeding of *Xiphinema diversicaudatum*. *Revue de Nématologie* **14**: 107-112
- Tzortzakakis, E.A. & D.J.F. Brown (1996): The absence of a tail mucro in *Xiphinema index* (Nematoda: Longidoridae) appears not to be an inherited characteristic. *Russian Journal of Nematology* **4**: 187-189
- Uehara, T.; Mizukubo, T.; Kushida, A. & Y. Momota (1998): Identification of *Pratylenchus coffeae* and *P. loosi* using specific primers for PCR amplification of ribosomal DNA. *Nematologica* **44**: 357-368
- Vrain, T.C. (1993): Restriction fragment length polymorphism separates species of the *Xiphinema americanum* group. *Journal of Nematology* **25**: 361-364
- Vrain, T.C., Wakarchuk, D.A., Levesque, A.C. & R.I. Hamilton (1992): Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. *Fundamental and Applied Nematology* **15**: 563-573
- Vuittenez, A.; Kuszala, J., Rüdél, M. & H. Brückbauer (1970): Détection et étude sérologique du virus latent des taches annulaires du fraisier (strawberry latent ringspot), du virus des anneaux noirs de la tomate (tomato black ring) et du virus des taches annulaires du framboisier (raspberry ringspot) chez des vignes du palatinat. *Annales de Phytopathologie* **2**: 279-327
- Waeyenberge, L.; Ryss, A.; Moens, M.; Pinochet, J. & T.C. Vrain (2000): Molecular characterisation of 18 *Pratylenchus* species using rDNA restriction fragment length polymorphism. *Nematology* **2**: 135-142
- Walker, A.; Wolpert, J.A.; Vilas, E.P.; Goheen, A.C. & L.A. Lider (1989): Resistant rootstocks may control fanleaf degeneration of grapevines. *California Agriculture*, March-April: 13-15
- Wang, X.; Bosselut, N.; Castagnone, C.; Voisin, R.; Abad, P. & D. Esmenjaud (2003): Multiplex polymerase chain reaction identification of single individuals of the Longidorid nematodes *Xiphinema index*, *X. diversicaudatum*, *X. vuittenezi*, and *X. italiae* using specific primers from ribosomal genes. *Phytopathology* **93**: 160-166

- Weischer, B. (1961): Nematoden im Weinbau. Weinberg und Keller **8**: 33-49
- Weischer, B. & D.J.F. Brown (2000): An introduction to nematodes: general nematology, a student's textbook. Pensoft Publishers, Sofia, Moskau. 187 S.
- Wendt, K.R.; Vrain, T.C. & J.M. Webster (1993): Separation of three species of *Ditylenchus* and some host races of *D. dipsaci* by restriction fragment length polymorphism. Journal of Nematology **25**: 555-563
- Whelan, S.; Liò, P. & N. Goldman (2001): Molecular phylogenetics: state-of-the-art methods for looking into the past. Trends in Genetics **17**: 262-272
- Winfield, A.L. (1974): Damage to roses by *Longidorus macrosoma*. Plant Disease Reporter **58**: 913-914
- Wright, F (2001): Notes on phylogenetic trees from molecular sequences. Bioinformatics and Statistics Scotland, UK.
- Wyss, U. (1970): Untersuchungen zur Populationsdynamik von *Longidorus elongatus*. Nematologica **16**: 74-84
- Yassin, A.M. (1969): Glass-house and laboratory studies on the biology of the needle nematode, *Longidorus elongatus*. Nematologica **15**: 169-178
- Zijlstra, C. (1997): A fast PCR assay to identify *Meloidogyne hapla*, *M. chitwoodi*, and *M. fallax*, and to sensitively differentiate them from each other and from *M. incognita* in mixtures. Fundamental and Applied Nematology **20**: 505-511
- Zijlstra, C.; Lever, A.E.M.; Uenk, B.J. & C.H. Van Silfhout (1995): Differences between ITS regions of isolates of root-knot nematodes *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. Phytopathology **85**: 1231-1237
- Zijlstra, C.; Uenk, B.J. & C.H. Van Silfhout (1997): A reliable, precise method to differentiate species of root-knot nematodes in mixtures on the basis of ITS-RFLPs. Fundamental and Applied Nematology **20**: 59-63

7. Liste der aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangenen Veröffentlichungen

Artikel

- **Hübschen, J.**; Kling, L.; Ipach, U.; Zinkernagel, V.; Bosselut, N.; Esmenjaud, D.; Brown, D.J.F. & R. Neilson (2004): Validation of the specificity and sensitivity of species-specific primers that provide a robust and reliable molecular diagnostic for *Xiphinema diversicaudatum*, *X. index* and *X. vuittenezi*. *European Journal of Plant Pathology*, in Druck.
- **Hübschen, J.**; Kling, L.; Ipach, U.; Zinkernagel, V.; Brown, D.J.F. & R. Neilson (2004): Development and validation of species-specific primers that provide a molecular diagnostic for virus-vector longidorid nematodes and related species in German viticulture. *European Journal of Plant Pathology*, in Druck.
- Neilson, R.; Ye, W.; Oliveira, C.M.G.; **Hübschen, J.**; Robbins, R.T.; Brown, D.J.F. & A.L. Szalanski: Phylogenetic relationships of selected species of Longidoridae (Nematoda: Longidoridae) from North America inferred from 18S rDNA gene sequence data. *Genome*, eingereicht.
- Oliveira, C.M.G.; **Hübschen, J.**; Brown, D.J.F.; Ferraz, L.C.C.B.; Wright, F. & R. Neilson (2004): Phylogenetic relationships among *Xiphinema* and *Xiphidorus* nematode species from Brazil inferred from 18S rDNA gene sequences. *Journal of Nematology*, in Druck.

Vorträge und Poster

- **Hübschen, J.**; Neilson, R.; Ipach, U. & D.J.F. Brown (2001): Phylogenetic relationships, based on 18S sequences, among some *Xiphinema* species with three and four juvenile developmental stages. *Association of Applied Biologists, Nematology Meeting*, 11.12.01, London
- **Hübschen, J.** (2002): Erste Untersuchungen zur molekularbiologischen Differenzierung virusübertragender Nematoden im deutschen Weinbau. *DPG-Tagung Nematologie*, 20.03.02, Neustadt an der Weinstraße
- **Hübschen, J.**; Ipach, U.; Zinkernagel, V.; Brown, D.J.F. & R. Neilson (2002): Virusübertragende Nematoden im Weinbau - Molekularbiologische Differenzierung von *Xiphinema*-Arten -. *FDW-Tagung*, 17.-18.04.02, Geisenheim
- **Hübschen, J.**; Neilson, R.; Ipach, U. & D.J.F. Brown (2002): Phylogenetic relationships based on 18S sequences among some *Xiphinema* species with three and four juvenile development stages. *Nematology* 4: 170

- **Hübschen, J.**; Ipach, U.; Zinkernagel, V.; Esmenjaud, D.; Brown, D.J.F. & R. Neilson (2002): Molecular diagnostics for virus-transmitting nematodes in German viticulture. *Nematology* 4: 170-171
- **Hübschen, J.**; Oliveira, M.; Auwerkerken, A.; Barsi, L.; Ferraz, L.; Ipach, U.; Lazarova, S.; Liskova, M.; Peneva, V.; Robbins, R.; Susulovsky, A.; Tzortzakais, M.; Ye, W.; Zheng, J.; Neilson, R. & D.J.F. Brown (2002): A phylogeny of selected Longidoridae based on 18S rDNA gene sequences. *Nematology* 4: 170
- **Hübschen, J.**; Ipach, U.; Zinkernagel, V.; Brown, D.J.F. & R. Neilson (2002): Molekularbiologische Differenzierung von virusübertragenden Nematoden im Weinbau und deren Nachweis durch artspezifische Primer. *53. Deutsche Pflanzenschutztagung*, 16.-19.09.02, Bonn
- **Hübschen, J.**; Oliveira, C.M.G.; Auwerkerken, A.; Barsi, L.; Ferraz, L.C.C.B.; Ipach, U.; Lazarova, S.; Liskova, M.; Peneva, V.; Robbins, R.T.; Susulovsky, A.; Tzortzakais, M.; Ye, W.; Zheng, J.; Tahseen, Q.; Fourie, H.; Lamberti, F.; Brown, D.J.F. & R. Neilson (2003): Phylogenetic analysis of selected Longidoridae based on 18s rDNA gene sequences. *Proceedings of the 16th NSSA Symposium*, 01.-04.07.03, Gordon' s Bay, Western Cape, Südafrika
- Neilson, R.; **Hübschen, J.**; de Oliveira, C.M.G.; Auwerkerken, A.; Barsi, L.; Ferraz, L.C.C.B.; Ipach, U.; Lazarova, S.; Liskova, M.; Peneva, V.; Robbins, R.T.; Susulovsky, A.; Tzortzakakis, M.; Ye, W.; Zheng, J. & D.J.F. Brown (2002): An 18S rDNA phylogeny of selected Longidoridae. *Proceedings of the 10th International Congress of Parasitology*, 03.-10.08.02, Vancouver, Kanada
- Oliveira, C.M.G.; **Hübschen, J.**; Brown, D.J.F.; Ferraz, L.C.C.B. & R. Neilson (2002): Phylogeny of selected *Xiphinema* and *Xiphidorus* nematode species from Brazil inferred from 18S rDNA gene sequences. *Association of Applied Biologists, Nematology Meeting*, 17.12.02, London
- Oliveira, C.M.G.; **Hübschen, J.**; Brown, D.J.F.; Monteiro, A.R.; Ferraz, L.C.C.B.; Wright F.G. & R. Neilson (2003): Taxonomic relationships of selected *Xiphinema* and *Xiphidorus* nematode species from Brazil based on morphometrics and 18S rDNA gene sequences. *55th International Symposium on Crop Protection*, 06.05.03, Gent, Belgien
- Oliveira, C.M.G.; **Hübschen, J.**; Brown, D.J.F.; Monteiro, A.R.; Ferraz, L.C.C.B.; Wright F.G. & R. Neilson (2003): Taxonomic relationships of selected *Xiphinema* and *Xiphidorus* nematode species from Brazil. *Proceedings of the 16th NSSA Symposium*, 01.-04.07.03, Gordon' s Bay, Western Cape, Südafrika

8. Anhang

Puffer und Reagenzien

TBE-Puffer nach MANIATIS *et al.* (1982):

Aus der 5x konzentrierten Stammlösung wurde durch Verdünnung mit sterilisiertem, destilliertem Wasser die einfach konzentrierte Arbeitslösung hergestellt.

TE-Puffer (pH 7,5) nach MANIATIS *et al.* (1982)

Gel-Beladungslösung (Schottland):

2,0 ml 0,5 M EDTA
6,0 ml 40 % Glycol
0,5 ml 20 % SDS
2,0 ml H₂O_{dest} und
ein paar Körner Bromphenolblau

Agarose (Deutschland)	Biozym
Agarose (Schottland)	Bioline
100 bp DNA Ladder (Deutschland)	Life Technologies
1 kb DNA Ladder (Schottland)	Promega
Ethidiumbromid (Deutschland)	Life Technologies
Ethidiumbromid (Schottland)	BDH Laboratory Supplies
PCR Purification Kit (Schottland)	QIAGEN Ltd.
NucleoSpin [®] Extract Kit (Deutschland)	Macherey-Nagel
Primer (Deutschland)	Carl Roth GmbH
Primer (Schottland)	Sigma-Genosys Ltd.
Ready-To-Go [™] PCR Beads	Amersham Pharmacia Biotech
Terminator Ready Reaction Mix	Applied Biosystems

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Judith Hübschen
Geburtsdatum: 31. Mai 1975
Geburtsort: Dillingen / Saar
Familienstand: ledig

Schulbildung

1981 - 1985 Grundschole Wadrill
1985 - 1991 Realschole Hermeskeil
1991 - 1994 Gymnasium Hermeskeil

Hochschulausbildung

1994 - 1995 Studium der Forstwissenschaft an der Albert-Ludwigs-
Universität Freiburg
1995 - 2000 Studium der Gartenbauwissenschaften an der
Technischen Universität München,
Diplomarbeit im Fach Phytopathologie:
“Testung der Resistenz von Rebsorten gegenüber
Pseudopezicula tracheiphila, dem Erreger des Roten
Brenners am Wein”

Berufliche Tätigkeit

2000 - 2003 Dissertation am Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum
- Rheinpfalz - in Neustadt an der Weinstrasse