

*Striga*-Resistenz in *Sorghum bicolor* und  
genetische Variabilität von *Striga hermonthica*

D I S S E R T A T I O N

der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

2002

vorgelegt von  
**Rainer Heller**

|                             |                                |
|-----------------------------|--------------------------------|
| Tag der mündlichen Prüfung: | 6.2.2002                       |
| Dekan:                      | Prof. Dr. H. Probst            |
| 1. Berichterstatter:        | Prof. Dr. Dr. h. c. K. Wegmann |
| 2. Berichterstatter:        | Prof. Dr. Hanns-Ulrich Seitz   |

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pflanzenbiochemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. h. c. Klaus Wegmann angefertigt. Prof. Wegmann danke ich für die Überlassung des interessanten Arbeitsthemas, seine Unterstützung bei der Durchführung, insbesondere seine Bereitschaft alle Theorien der Resistenz ausgiebig zu diskutieren.

Prof. Dr. Hanns-Ulrich Seitz danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Mein Dank gilt Prof. Dr. E. S. Teryokhin, Komarov Botanisches Institut, St. Petersburg, Rußland für seine genauen morphologischen Untersuchungen an *Striga hermonthica* der verschiedenen Herkunft sowie deren taxonomische Einordnung. Horst Schoppmann und Prof. Dr. C.-F. Bardele vom Zoologischen Institut, Abt. Spezielle Zoologie, Universität Tübingen danke ich für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der *Striga hermonthica*-Samen. Prof. Dr. K. Albert vom Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen danke ich für die NMR-Aufnahmen der Sorghum-Wurzelproben. Dr. W. Mayer vom Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. Immunogenetik, Tübingen danke ich für seine selbstlose Unterstützung bei der phylogenetischen Auswertung der RAPD-Bandenmuster. Dr. Babett Oberwalder, Birgit Löffelhardt und Dr. L. Schilde danke ich für die Unterstützung bei den molekularbiologischen Untersuchungen, Prof. Dr. H. Ninnemann für die Mitbenutzung der Laboreinrichtungen.

Bernd Schuchardt danke ich für die Wegweisung im Labyrinth der Gerätschaften, Dr. Ursula Kummer für ihre kompetenten Ratschläge, Dr. Immanuel Heck und Dr. Josef Maier für ihre Unterstützung im Kampf gegen die Unbilden der elektronischen Gesellschaft und für so manch anderes mehr. Allen Mitarbeitern des Instituts gilt mein Dank für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, ohne deren Unterstützung die Durchführung der Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Die Arbeit wurde im Rahmen des *Restricted Core Project* „*Striga* Resistance in Sorghum“ *Project-No. 94.7860.3-01.100* vom Bundesministerium für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (BMZ) unterstützt.

Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit wurde veröffentlicht in:

Heller, R. und Wegmann, K. (2000) Mechanisms of resistance to *Striga hermonthica* (Del.) Benth. in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. In: B. I. G. Haussmann, Hess, D. E., Koyama, M. L., Grivet, L., Rattunde, H. F. W. und Geiger, H. H. (Hrsg.), Breeding for *Striga* Resistance in Cereals. Proceedings of a Workshop. IITA, Ibadan, Nigeria, Markgraf Verlag, Weikersheim, S. 19-28.

## I INHALTSVERZEICHNIS

|           |                                                                                    |    |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| II        | ABKÜRZUNGEN.....                                                                   | IX |
| 1         | EINFÜHRUNG .....                                                                   | 1  |
| 1.1       | Parasitische Pflanzen.....                                                         | 1  |
| 1.2       | <i>Striga</i> spp. ....                                                            | 2  |
| 1.3       | <i>Striga hermonthica</i> (Del.) Benth. und <i>Striga senegalensis</i> Benth. .... | 3  |
| 1.3.1     | Vorkommen und Eigenschaften .....                                                  | 3  |
| 1.3.2     | Lebenszyklus .....                                                                 | 6  |
| 1.3.2.1   | Samenverbreitung.....                                                              | 7  |
| 1.3.2.2   | Keimruhe.....                                                                      | 7  |
| 1.3.2.3   | Konditionierung .....                                                              | 8  |
| 1.3.2.4   | Keimung .....                                                                      | 8  |
| 1.3.2.5   | Haustorium.....                                                                    | 12 |
| 1.3.2.6   | Vegetatives Wachstum .....                                                         | 14 |
| 1.3.2.7   | Auswirkungen auf den Wirt .....                                                    | 15 |
| 1.3.3     | Kontrolle von <i>Striga hermonthica</i> .....                                      | 16 |
| 1.3.3.1   | Mechanische Kontrolle.....                                                         | 16 |
| 1.3.3.2   | Chemische Kontrolle .....                                                          | 16 |
| 1.3.3.3   | Physikalische Kontrolle .....                                                      | 17 |
| 1.3.3.4   | Biologische Kontrolle.....                                                         | 18 |
| 1.3.3.5   | Integrierter Anbau .....                                                           | 18 |
| 1.3.3.6   | Resistenzzüchtung.....                                                             | 19 |
| 1.3.3.6.1 | <i>Low stimulant</i> .....                                                         | 20 |
| 1.3.3.6.2 | <i>Low haustorial</i> .....                                                        | 21 |
| 1.3.3.6.3 | Inkompatibilität bei der Haustorialentwicklung .....                               | 21 |
| 1.3.3.6.4 | Hemmung der Parasiten-Exoenzyme durch Wirtswurzelexsudate .....                    | 21 |
| 1.3.3.6.5 | Mechanische Resistenz.....                                                         | 22 |
| 1.3.3.6.6 | Vermeidung .....                                                                   | 22 |
| 1.3.3.6.7 | Antibiosis – Phytohormonversorgung.....                                            | 22 |
| 1.3.3.6.8 | Phytoalexine .....                                                                 | 23 |
| 1.3.3.6.9 | Insensitivität gegenüber <i>Striga</i> -Toxin .....                                | 24 |

---

|         |                                                                                                  |    |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.4     | Genetische Grundlagen des Wirt-Parasit-Systems .....                                             | 24 |
| 1.4.1   | Genetik der Wirtspflanzenresistenz .....                                                         | 24 |
| 1.4.2   | Variabilität und Wirtsspezifität des Parasiten <i>Striga hermonthica</i> .....                   | 25 |
| 1.4.3   | Genetik von <i>Striga hermonthica</i> .....                                                      | 26 |
| 1.5     | Ziele der Arbeit .....                                                                           | 28 |
| 1.5.1   | Wirt-Parasit-Interaktion von Sorghum und Pearl-Millet mit <i>Striga hermonthica</i> .....        | 28 |
| 1.5.2   | Morphologische Charakterisierung und genetische Variabilität von <i>Striga hermonthica</i> ..... | 29 |
| 1.5.2.1 | RFLP-Analyse .....                                                                               | 30 |
| 1.5.2.2 | RAPD-PCR .....                                                                                   | 31 |
| 1.5.2.3 | Phylogenetische Untersuchungen .....                                                             | 32 |
| 1.5.3   | <i>In vitro</i> -Kultur von <i>Striga hermonthica</i> .....                                      | 33 |
| 2       | MATERIAL .....                                                                                   | 35 |
| 2.1     | Organismen .....                                                                                 | 35 |
| 2.1.1   | Saatgut .....                                                                                    | 35 |
| 2.1.2   | Pflanzenmaterial .....                                                                           | 37 |
| 2.1.3   | Pilzstämme .....                                                                                 | 37 |
| 2.2     | RFLP-Analysen .....                                                                              | 37 |
| 2.3     | RAPD-PCR .....                                                                                   | 39 |
| 2.4     | Geräte .....                                                                                     | 39 |
| 2.5     | Computersoftware .....                                                                           | 41 |
| 2.6     | Materialien .....                                                                                | 41 |
| 2.7     | Chemikalien, Lösungsmittel und Enzyme .....                                                      | 42 |
| 2.7.1   | Chemikalien .....                                                                                | 42 |
| 2.7.2   | Lösungsmittel .....                                                                              | 44 |
| 2.7.3   | Enzyme .....                                                                                     | 44 |
| 2.7.4   | Puffer, Lösungen, Testsysteme und Medien .....                                                   | 45 |
| 2.7.4.1 | Puffer und Lösungen .....                                                                        | 45 |
| 2.7.4.2 | Exoenzym-Testsysteme .....                                                                       | 48 |
| 2.7.4.3 | Medien .....                                                                                     | 48 |
| 3       | METHODEN .....                                                                                   | 51 |
| 3.1     | Allgemeine Verfahren .....                                                                       | 51 |
| 3.1.1   | Sterilisation .....                                                                              | 51 |

|           |                                                                                                                                     |    |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.2     | Bestimmung der Keimfähigkeit der Samen im TTC-Test .....                                                                            | 51 |
| 3.2       | <i>Sorghum bicolor</i> und Pearl-Millet ( <i>Pennisetum glaucum</i> ).....                                                          | 52 |
| 3.2.1     | Oberflächensterilisation der Samen von Sorghum und Millet .....                                                                     | 52 |
| 3.2.2     | Anzucht für <i>In vitro</i> -Versuche und für Exsudatgewinnung .....                                                                | 52 |
| 3.2.3     | Bestimmung der Keimungsrate .....                                                                                                   | 52 |
| 3.2.4     | Identifizierung von Exoenzym-beeinflussenden Stoffen.....                                                                           | 52 |
| 3.2.4.1   | Gewinnung von Sorghum-Wurzelexsudaten .....                                                                                         | 52 |
| 3.2.4.2   | Test auf Beeinflussung der Aktivität von Exoenzymen.....                                                                            | 53 |
| 3.2.4.2.1 | Endocellulase-Aktivitätstest.....                                                                                                   | 53 |
| 3.2.4.2.2 | Endoxylanase-Aktivitätstest.....                                                                                                    | 54 |
| 3.2.4.2.3 | $\beta$ -Glucosidase-Aktivitätstest .....                                                                                           | 55 |
| 3.2.4.2.4 | Polygalacturonase-Aktivitätstest.....                                                                                               | 55 |
| 3.2.5     | Identifizierung von Phytoalexinen aus der Wurzel von <i>Sorghum bicolor</i> -Varietäten.....                                        | 56 |
| 3.2.5.1   | Pilanzucht und Gewinnung von Pilzsporen.....                                                                                        | 56 |
| 3.2.5.2   | Bestimmung des Sporentiters und Einstellen der Sporensuspension.....                                                                | 57 |
| 3.2.5.3   | Elicitierung und Gewinnung von Sorghum-Wurzelexsudaten und -extrakten .....                                                         | 57 |
| 3.2.5.4   | Dünnschichtchromatographie .....                                                                                                    | 58 |
| 3.2.5.5   | Bioautographie .....                                                                                                                | 58 |
| 3.2.6     | Bestimmung des Ligningehalts von Sorghum-Wurzeln mittels $^{13}\text{C}$ -Festkörper-<br>Kernspinresonanz (NMR)-Spektroskopie ..... | 59 |
| 3.3       | <i>Striga hermonthica</i> .....                                                                                                     | 60 |
| 3.3.1     | Oberflächensterilisation der Samen .....                                                                                            | 60 |
| 3.3.2     | Keimung.....                                                                                                                        | 61 |
| 3.3.2.1   | Konditionierung .....                                                                                                               | 61 |
| 3.3.2.2   | Bestimmung der Keimungsrate.....                                                                                                    | 61 |
| 3.3.2.3   | Keimungsinduktion.....                                                                                                              | 62 |
| 3.3.2.3.1 | Keimungsstimulans GR 24 .....                                                                                                       | 62 |
| 3.3.2.3.2 | Anzahl der Samen im Test .....                                                                                                      | 62 |
| 3.3.3     | Haustorialentwicklung.....                                                                                                          | 62 |
| 3.3.4     | Anzucht von <i>Striga hermonthica</i> in verschiedenen Systemen .....                                                               | 63 |
| 3.3.4.1   | Anzucht auf Wirtspflanzen im Gewächshaus.....                                                                                       | 63 |
| 3.3.4.1.1 | Anzucht der Wirte <i>Sorghum bicolor</i> und Pearl-Millet ( <i>Pennisetum glaucum</i> ) ...                                         | 63 |

|           |                                                                                                                                                     |    |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3.4.1.2 | Anzucht auf den Wirten Sorghum und Millet im Topfversuch .....                                                                                      | 63 |
| 3.3.4.2   | Cokulturen <i>Striga hermonthica</i> – <i>Sorghum bicolor</i> in Petrischalen .....                                                                 | 64 |
| 3.3.4.3   | <i>In vitro</i> -Kulturen .....                                                                                                                     | 64 |
| 3.3.4.3.1 | Gewebekulturen aus Achselknospen .....                                                                                                              | 64 |
| 3.3.4.3.2 | <i>In vitro</i> -Kulturen aus Samen .....                                                                                                           | 65 |
| 3.3.4.3.3 | Erhaltung der <i>In vitro</i> -Kulturen .....                                                                                                       | 65 |
| 3.3.4.3.4 | Untersuchung von ins Nährmedium abgegebenen Stoffen .....                                                                                           | 66 |
| 3.3.5     | Morphologische Charakterisierung von <i>Striga hermonthica</i> .....                                                                                | 66 |
| 3.3.5.1   | Samen .....                                                                                                                                         | 66 |
| 3.3.5.2   | Blüten .....                                                                                                                                        | 66 |
| 3.4       | Molekularbiologische Methoden – Genetische Variabilität von <i>Striga hermonthica</i> .....                                                         | 66 |
| 3.4.1     | Isolierung von Gesamt-DNA aus Gewächshaus- und <i>In vitro</i> -Pflanzen .....                                                                      | 67 |
| 3.4.2     | Bestimmung der DNA-Konzentration und Reinheit .....                                                                                                 | 67 |
| 3.4.3     | RFLP-Analysen .....                                                                                                                                 | 68 |
| 3.4.3.1   | Restriktionsverdau .....                                                                                                                            | 68 |
| 3.4.3.2   | DNA-Gelelektrophorese .....                                                                                                                         | 68 |
| 3.4.3.3   | <i>Southern-Transfer (Southern-Blot)</i> .....                                                                                                      | 68 |
| 3.4.3.4   | Fixierung der DNA auf der Membran .....                                                                                                             | 69 |
| 3.4.3.5   | DIG-nichtradioaktives System zur Nukleinsäure-Markierung und -Detektion .....                                                                       | 69 |
| 3.4.3.5.1 | Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Sonden .....                                                                                              | 70 |
| 3.4.3.5.2 | Detektion .....                                                                                                                                     | 71 |
| 3.4.3.5.3 | Strippen von Membranen .....                                                                                                                        | 72 |
| 3.4.4     | RAPD-PCR .....                                                                                                                                      | 72 |
| 3.4.4.1   | RNase-Verdau .....                                                                                                                                  | 72 |
| 3.4.4.2   | PCR-Ablauf .....                                                                                                                                    | 73 |
| 3.4.4.3   | Auftrennen der PCR-Produkte .....                                                                                                                   | 74 |
| 3.4.4.4   | Detektion und Bandenbestimmung .....                                                                                                                | 74 |
| 3.4.5     | Phylogenetische Auswertung .....                                                                                                                    | 74 |
| 3.5       | Interaktion Wirt – Parasit <i>Striga hermonthica</i> . Identifizierung keimungsinduzierender<br>Stoffe in Sorghum- und Millet-Wurzelexsudaten ..... | 75 |
| 3.5.1     | Gewinnung von Wirtswurzelexsudaten .....                                                                                                            | 75 |
| 3.5.2     | Keimungstest mit <i>Striga hermonthica</i> -Samen .....                                                                                             | 76 |



|           |                                                                                                                                     |    |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.5.3     | Konzentrierung keimungsinduzierender Stoffe.....                                                                                    | 76 |
| 3.5.4     | Dünnschichtchromatographie .....                                                                                                    | 77 |
| 3.5.4.1   | Bedampfung.....                                                                                                                     | 77 |
| 3.5.4.2   | Farbreagentien.....                                                                                                                 | 78 |
| 3.5.4.3   | Bioautographie mit <i>Striga hermonthica</i> -Samen .....                                                                           | 79 |
| 3.5.4.3.1 | Test auf Verbreiterung .....                                                                                                        | 79 |
| 3.5.4.3.2 | Testsystem .....                                                                                                                    | 79 |
| 4         | ERGEBNISSE .....                                                                                                                    | 81 |
| 4.1       | <i>Sorghum bicolor</i> und Pearl-Millet ( <i>Pennisetum glaucum</i> ).....                                                          | 81 |
| 4.1.1     | Bestimmung der Keimungsrate .....                                                                                                   | 81 |
| 4.1.2     | Bestimmung der Keimfähigkeit von Sorghum-Samen im TTC-Test.....                                                                     | 82 |
| 4.1.3     | Identifizierung von Exoenzym-beeinflussenden Stoffen.....                                                                           | 82 |
| 4.1.3.1   | Endocellulase-Aktivitätstest .....                                                                                                  | 83 |
| 4.1.3.2   | Endoxylanase-Aktivitätstest .....                                                                                                   | 83 |
| 4.1.3.3   | $\beta$ -Glucosidase-Aktivitätstest.....                                                                                            | 85 |
| 4.1.3.4   | Polygalacturonase-Aktivitätstest.....                                                                                               | 85 |
| 4.1.4     | Identifizierung von Phytoalexinen aus der Wurzel von <i>Sorghum bicolor</i> -Varietäten.....                                        | 86 |
| 4.1.4.1   | Dünnschichtchromatographie .....                                                                                                    | 86 |
| 4.1.4.2   | Bioautographie .....                                                                                                                | 88 |
| 4.1.5     | Bestimmung des Ligningehalts von Sorghum-Wurzeln mittels $^{13}\text{C}$ -Festkörper-<br>Kernspinresonanz (NMR)-Spektroskopie ..... | 89 |
| 4.2       | <i>Striga hermonthica</i> .....                                                                                                     | 92 |
| 4.2.1     | Bestimmung der Keimfähigkeit der Samen im TTC-Test.....                                                                             | 92 |
| 4.2.2     | Keimung.....                                                                                                                        | 93 |
| 4.2.2.1   | Konditionierung .....                                                                                                               | 93 |
| 4.2.2.2   | Keimungsinduktion.....                                                                                                              | 94 |
| 4.2.2.2.1 | Keimungsstimulans GR 24 .....                                                                                                       | 94 |
| 4.2.2.2.2 | Anzahl der Samen im Test .....                                                                                                      | 94 |
| 4.2.3     | Haustorialentwicklung.....                                                                                                          | 95 |
| 4.2.4     | Pflanzenanzucht .....                                                                                                               | 95 |
| 4.2.4.1   | Anzucht auf den Wirten Sorghum und Millet im Topfversuch.....                                                                       | 95 |
| 4.2.4.2   | Cokulturen <i>Striga hermonthica</i> – <i>Sorghum bicolor</i> in Petrischalen .....                                                 | 97 |

|           |                                                                                               |     |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.2.4.3   | <i>In vitro</i> -Kulturen .....                                                               | 98  |
| 4.2.4.3.1 | Gewebekulturen aus Achselknospen .....                                                        | 98  |
| 4.2.4.3.2 | <i>In vitro</i> -Kulturen aus Samen .....                                                     | 99  |
| 4.2.4.3.3 | Pflanzenentwicklung in den <i>In vitro</i> -Kulturen .....                                    | 100 |
| 4.2.4.3.4 | Untersuchung von ins Nährmedium abgegebenen Stoffen.....                                      | 101 |
| 4.2.5     | Morphologische Charakterisierung von <i>Striga hermonthica</i> .....                          | 101 |
| 4.2.5.1   | Samen .....                                                                                   | 101 |
| 4.2.5.2   | Blüten .....                                                                                  | 102 |
| 4.2.6     | Genetische Variabilität von <i>Striga hermonthica</i> – Molekularbiologische Methoden.....    | 103 |
| 4.2.6.1   | DNA-Isolierung.....                                                                           | 103 |
| 4.2.6.2   | RFLP-Analysen .....                                                                           | 104 |
| 4.2.6.3   | RAPD-PCR .....                                                                                | 106 |
| 4.2.6.3.1 | Untersuchungsmaterial.....                                                                    | 106 |
| 4.2.6.3.2 | PCR-Bedingungen.....                                                                          | 107 |
| 4.2.6.3.3 | Primer .....                                                                                  | 107 |
| 4.2.6.3.4 | RAPD-PCR-Analysen .....                                                                       | 112 |
| 4.2.7     | Phylogenetische Auswertung .....                                                              | 113 |
| 4.2.7.1   | Dendrogramme basierend auf Einzelproben .....                                                 | 113 |
| 4.2.7.2   | Untersuchungen auf Populationsebene.....                                                      | 118 |
| 4.2.7.2.1 | Gendiversität in den Populationen.....                                                        | 118 |
| 4.2.7.2.2 | Genetische Distanz und genetische Identität .....                                             | 119 |
| 4.2.7.2.3 | Dendrogramm basierend auf den Populationsdaten.....                                           | 119 |
| 4.3       | Interaktion Wirt – Parasit <i>Striga hermonthica</i> .....                                    | 122 |
| 4.3.1     | Identifizierung keimungsinduzierender Stoffe in Sorghum- und Millet-<br>Wurzelexsudaten ..... | 122 |
| 4.3.1.1   | Keimungstests mit Sorghum- und Millet-Wurzelexsudaten .....                                   | 122 |
| 4.3.1.2   | Konzentrierung keimungsinduzierender Stoffe .....                                             | 122 |
| 4.3.1.3   | Dünnschichtchromatographie .....                                                              | 124 |
| 4.3.1.4   | Bioautographie mit <i>Striga hermonthica</i> -Samen .....                                     | 125 |
| 4.3.1.4.1 | Test auf Verbreiterung .....                                                                  | 125 |
| 4.3.1.4.2 | DC-Biotest .....                                                                              | 126 |
| 5         | DISKUSSION .....                                                                              | 133 |

|           |                                                                                                       |     |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.1       | Resistenz gegenüber <i>Striga hermonthica</i> .....                                                   | 135 |
| 5.1.1     | Parasitische Exoenzyme .....                                                                          | 135 |
| 5.1.2     | Phytoalexine .....                                                                                    | 136 |
| 5.1.3     | Lignifizierung .....                                                                                  | 137 |
| 5.1.4     | Keimung .....                                                                                         | 138 |
| 5.1.4.1   | Keimungsrate und TTC-Test .....                                                                       | 138 |
| 5.1.4.2   | Konditionierung .....                                                                                 | 140 |
| 5.1.4.3   | Keimungsinduktion .....                                                                               | 140 |
| 5.1.4.4   | Keimungsrate in Abhängigkeit der Samenzahl im Test .....                                              | 141 |
| 5.2       | Interaktion Wirt – Parasit <i>Striga hermonthica</i> .....                                            | 141 |
| 5.2.1     | Keimungsinduzierende Stoffe in Sorghum- und Millet-Wurzelexsudaten .....                              | 141 |
| 5.2.1.1   | Konzentrieren keimungsinduzierender Stoffe .....                                                      | 141 |
| 5.2.1.2   | Dünnschichtchromatographie .....                                                                      | 142 |
| 5.2.1.3   | Bioautographie mit <i>Striga hermonthica</i> -Samen .....                                             | 143 |
| 5.2.2     | Haustorialentwicklung .....                                                                           | 145 |
| 5.2.3     | Pflanzenanzucht und Testsysteme .....                                                                 | 147 |
| 5.2.3.1   | Anzucht von <i>Striga hermonthica</i> auf Sorghum und Millet im Gewächshaus .....                     | 147 |
| 5.2.3.2   | Cokulturen <i>Striga hermonthica</i> – <i>Sorghum bicolor</i> in Petrischalen .....                   | 148 |
| 5.2.3.3   | <i>In vitro</i> -Kulturen von <i>Striga hermonthica</i> .....                                         | 150 |
| 5.2.3.4   | Akkumulation der von <i>Striga hermonthica</i> abgegebenen Stoffe im Nährmedium .....                 | 151 |
| 5.3       | Morphologische Charakterisierung und genetischer Fingerabdruck von<br><i>Striga hermonthica</i> ..... | 152 |
| 5.3.1     | Morphologie der Blüten und Samen .....                                                                | 153 |
| 5.3.2     | Molekularbiologische Methoden .....                                                                   | 154 |
| 5.3.2.1   | DNA-Isolierung .....                                                                                  | 154 |
| 5.3.2.2   | RFLP-Analysen .....                                                                                   | 155 |
| 5.3.2.3   | RAPD-PCR .....                                                                                        | 156 |
| 5.3.2.4   | Phylogenetische Auswertung .....                                                                      | 157 |
| 5.3.2.4.1 | Dendrogramme basierend auf Einzelproben .....                                                         | 157 |
| 5.3.2.4.2 | Untersuchungen auf Populationsebene .....                                                             | 158 |
| 5.3.2.4.3 | Gesamtbetrachtung der phylogenetischen Untersuchungen .....                                           | 159 |
| 5.3.3     | Taxonomische Einordnung der Herkünfte .....                                                           | 159 |

---

|     |                                                |     |
|-----|------------------------------------------------|-----|
| 6   | ZUSAMMENFASSUNG .....                          | 161 |
| 7   | ANHANG .....                                   | 163 |
| 8   | LITERATURVERZEICHNIS .....                     | 171 |
| 9   | VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN ..... | 191 |
| 9.1 | Abbildungen .....                              | 191 |
| 9.2 | Tabellen.....                                  | 192 |

## II ABKÜRZUNGEN

|                 |                                                                               |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Ø               | Durchmesser                                                                   |
| 2,4-D           | 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure                                                  |
| 2,6-DMBQ        | engl. <i>2,6-dimethoxy-benzoquinone</i> , 2,6-Dimethoxy-p-benzochinon         |
| ABA             | engl. <i>abscisic acid</i> , Abscisinsäure                                    |
| Abb.            | Abbildung                                                                     |
| bidest.         | bidestilliert                                                                 |
| bp              | Basenpaar(e)                                                                  |
| C               | Kohlenstoff                                                                   |
| CEPA            | engl. <i>2-chloroethyl-phosphonic acid</i> , 2-Chlorethanphosphonsäure        |
| CTAB            | Cetyltrimethylammoniumbromid                                                  |
| DC              | Dünnschichtchromatographie                                                    |
| DIG             | Digoxigenin                                                                   |
| DNA             | engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure, DNS              |
| dUTP            | Desoxyuridintriphosphat                                                       |
| FG              | Frischgewicht                                                                 |
| GA <sub>3</sub> | Gibberellinsäure                                                              |
| GD              | Genetische Distanz                                                            |
| GI              | Genetische Identität                                                          |
| <i>h</i>        | Gendiversität nach NEI (1973)                                                 |
| H               | Höhe                                                                          |
| HPLC            | <i>High Performance Liquid Chromatography</i>                                 |
| ICRISAT         | <i>International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics</i>       |
| IES             | Indolessigsäure                                                               |
| Kap.            | Kapitel                                                                       |
| MP              | engl. <i>Maximum Parsimony</i> , Maximale Sparsamkeit                         |
| MS              | (Medium nach) MURASHIGE und SKOOG                                             |
| NEB             | engl. <i>Neutral Electrophoresis Buffer</i> , Neutraler Elektrophorese-Puffer |
| NMR             | engl. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> , Kernspinresonanz                    |
| p. a.           | lat. <i>pro analysi</i> (chemischer Reinheitsgrad)                            |
| PCR             | engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerasekettenreaktion             |
| RAPD            | engl. <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>                                 |
| rDNA            | ribosomale DNA                                                                |
| REM             | Rasterelektronenmikroskopie                                                   |
| RFLP            | Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus                                      |
| RG              | Reaktionsgefäß                                                                |

|       |                                                                       |
|-------|-----------------------------------------------------------------------|
| RNA   | engl. <i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure, RNS                 |
| rRNA  | ribosomale RNA                                                        |
| RT    | Raumtemperatur                                                        |
| SSR   | engl. <i>Simple Sequence Repeats</i> , einfache Sequenzwiederholungen |
| T     | Temperatur                                                            |
| Tab.  | Tabelle                                                               |
| TTC   | 2,3,5-Triphenyl-tetrazoliumchlorid                                    |
| UPGMA | engl. <i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages</i>    |
| UV    | ultraviolett                                                          |
| VE    | vollentsalzt                                                          |
| vis   | engl. <i>visible</i> , sichtbar                                       |

# 1 EINFÜHRUNG

## 1.1 Parasitische Pflanzen

Wechselbeziehungen zwischen verschiedenen Organismen sind in der Natur allgegenwärtig. Das „Zusammenleben ungleichnamiger Organismen“ bezeichnet man nach DE BARY (1879) als *Symbiose*. Dabei werden drei Grundformen unterschieden, die Übergänge sind allerdings fließend (STARR 1975):

1. Mutualismus – beide Organismen ziehen einen Nutzen aus der Beziehung,
2. Kommensalismus – ein Organismus zieht Nutzen aus der Beziehung, ohne dem anderen zu schaden und
3. Parasitismus – ein Organismus lebt auf Kosten des anderen Organismus (seines Wirts).

Wechselwirkungen unter Beteiligung höherer Pflanzen finden in verschiedenen Formen statt: Mutualistischer Natur sind z. B. Mykorrhiza und die Beziehungen mit Stickstoff-fixierenden Bakterien, dagegen sind solche mit zwei beteiligten höheren Pflanzen meist parasitischer Natur. Man schätzt, daß rund 1 % aller Blütenpflanzen, also rund 3000 Arten, Parasiten sind. Ein Merkmal parasitisch wachsender Pflanzen ist ihre Fähigkeit, einen Kontakt zum Gefäßsystem ihres Wirts herzustellen. So können sie, je nach Art, Wasser, Nährsalze oder auch Metaboliten dem Wirt entziehen. Die Abhängigkeit von der Wirtsversorgung variiert dabei von Art zu Art. Die Klassifizierung der Parasiten erfolgt nach dem Organ, an dem sie ihre Verbindung zum Wirt herstellen (Wurzel- oder Sproßparasiten) und nach dem Vorhanden- oder Nichtvorhandensein von Chlorophyll (Hemi- oder Holoparasiten) (STEWART *et al.* 1989). Etwa 60 % der Parasiten sind Wurzelparasiten und 20 % Holoparasiten. Parasitische Pflanzen findet man in mindestens siebzehn Familien. Acht von ihnen sind von besonderem Interesse, da sie Parasitenarten umfassen, die agronomisch wichtige Pflanzen, zum Beispiel Getreidearten, befallen: *Santalaceae*, *Viscaceae*, *Loranthaceae*, *Convolvulaceae*, *Lauraceae*, *Balanophoraceae*, *Orobanchaceae* und *Scrophulariaceae*. Neuere Untersuchungen der rRNA-Gene zeigten jedoch, daß die klassische Trennung in die zwei selbständigen Familien *Orobanchaceae* und *Scrophulariaceae* nicht länger haltbar ist (NICKRENT und DUFF 1996). Parasiten, die man zu den *Scrophulariaceae* zählt, sind Wurzelparasiten (parasitische Unkräuter). Viele Gattungen der *Scrophulariaceae* sind agronomisch bedeutsam: *Alectra*, *Buchnera*, *Melampyrum*, *Odontites*, *Rhamphicarpa*, *Rhinanthus*, *Seymeria* und *Striga* (MOLAU 1995, RICHES und PARKER 1995). Den größten landwirtschaftlichen Schaden richten die obligaten Parasiten der Gattungen *Striga* und

*Orobanche* (aus der Familie der *Orobanchaceae*) an.

## 1.2 *Striga* spp.

Zur Gattung *Striga* zählt man derzeit 41 Arten (RAYNAL-ROQUES 1996), elf davon befallen Feldfrüchte. Die meisten *Striga*-Arten parasitieren Monokotyledonen, mit einer Ausnahme: *Striga gesneroides* befällt nur Dikotyledonen. Betroffen sind vor allem Mais (*Zea mays*), Sorghum (*Sorghum bicolor*), Pearl-Millet (*Pennisetum glaucum*), Finger-Millet (*Eleusine coracana*), Reis (*Oryza sativa*) und Kuhbohne (*Vigna unguiculata*). Darüber hinaus werden auch Zuckerrohr (*Saccharum* spp.), Liebesgras (*Eragrostis tef*), Süßkartoffel (*Ipomoea batatas*) und Erdnuß (*Arachis hypogaea*) befallen. Die Zahl der Wirte unter den Wildpflanzen ist unbekannt. *Striga* wird heute als einer der größten Schädlinge weltweit bezeichnet (PARKER und RICHES 1993, MACILWAIN 1999). Das Hauptausbreitungsgebiet liegt in den semi-ariden Gebieten Afrikas und Teilen Asiens. Es wird geschätzt, daß mehr als 73 Mha landwirtschaftlich genutzter Flächen betroffen sind. Zwei Drittel dieser Felder sind so stark mit *Striga* infiziert, daß die Erträge an Feldfrüchten empfindlich reduziert sind. Gemittelt über ganz Afrika liegen die Einbußen bei rund 40 %. Das entspricht einem jährlichen Verlust von umgerechnet sieben Milliarden US\$ (MBOOB 1986). In bestimmten Gebieten Afrikas (Äthiopien und Sudan) erreichen die Verluste sogar 65–100 % (LAGOKE *et al.* 1991). Damit ist *Striga* einer der limitierenden Faktoren in der Nahrungsmittelproduktion für über 300 Millionen Menschen in Afrika (BABALEYE 1989). Der Name *Striga* leitet sich vom lateinischen *strix*, *strigis* ab, was „Hexe“ bedeutet. Auch die englische Bezeichnung *witchweed* bedeutet Ähnliches, nämlich Hexenkraut. Beide Bezeichnungen beschreiben das gleiche Phänomen: Durch den unterirdischen Wurzelangriff des Parasiten zeigen Wirtspflanzen schon eine Schädigung, bevor überhaupt eine *Striga*-Pflanze oberirdisch sichtbar wird – die Wirtspflanzen sind „verhext“. Probleme in der tropischen Landwirtschaft bereiten hauptsächlich drei Arten (PARKER und RICHES 1993):

- *S. asiatica* auf Getreide,
- *S. gesneroides* auf Leguminosen (z. B. Kuhbohne) und Tabak (*Nicotiana tabacum*),
- *S. hermonthica* auf Getreide.

Die Mitglieder der Gattung *Striga* sind sehr anpassungsfähig. So ist zu befürchten, daß neben den drei oben genannten in Zukunft auch weitere *Striga*-Arten Kulturpflanzen befallen können, zum Beispiel *S. aspera* oder *S. angustifolia* (RAYNAL-ROQUES 1994).



### 1.3 *Striga hermonthica* (Del.) Benth. und *Striga senegalensis* Benth.

#### 1.3.1 Vorkommen und Eigenschaften

##### *Striga hermonthica* (Del.) Benth.

*Striga hermonthica* (Del.) Benth. ist im tropischen Afrika weit verbreitet, von den semi-ariden Gebieten in Äthiopien und dem Sudan bis zu den feuchten Savannen Westafrikas und dem Victoriasee-Becken im Osten. Im Süden erstreckt sich das Verbreitungsgebiet bis nach Angola und Namibia, die nördlichen Ausläufer reichen bis nach Südwestarabien. Außerhalb Afrikas findet man *S. hermonthica* auch auf Madagaskar, im Jemen sowie in Saudi-Arabien (MUSSELMAN 1987) (Abb. 1-1).

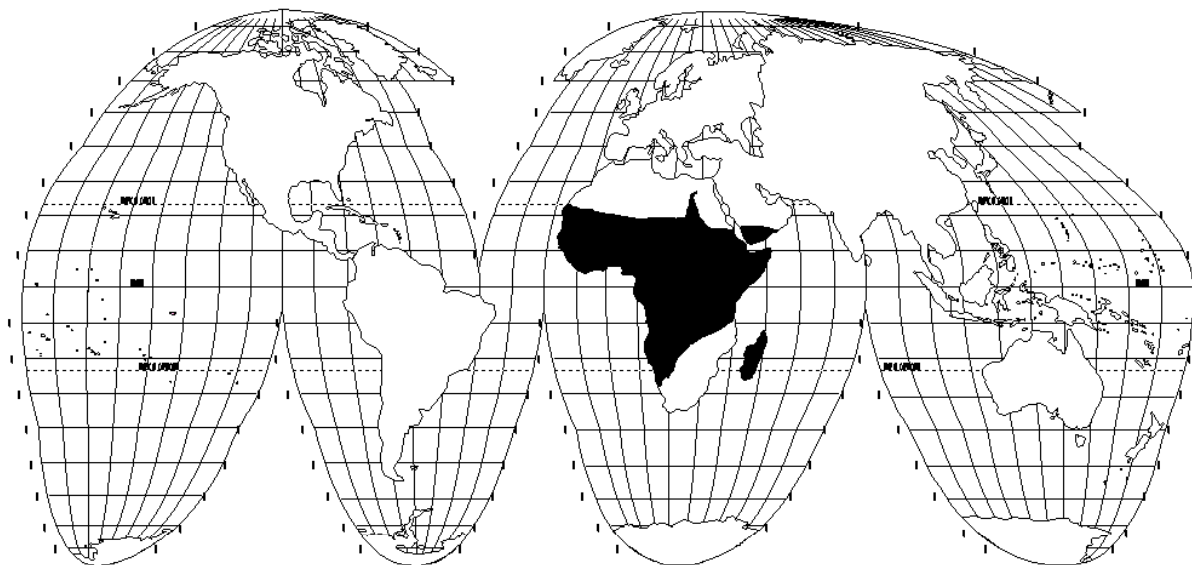


Abb. 1-1: Verbreitung von *Striga hermonthica* – Hauptverbreitungsgebiete schwarz gefärbt (nach MUSSELMAN *et al.* 1988).

Der Ursprung von *S. hermonthica* könnte im Nuba-Gebirge des Sudan und in angrenzenden Gebieten Äthiopiens liegen (MUSSELMAN *et al.* 1988). Grund für diese Annahme ist das häufigere Auftreten von *S. hermonthica* auf Wildgräsern in diesen Gebieten, vor allem auf *Setaria incrassata*. Dagegen spricht die sehr schnelle Entwicklung und Verbreitung von *S. hermonthica* in Äthiopien in den letzten hundert Jahren. Letztere könnte jedoch auch in der intensivierten Landwirtschaft begründet liegen (PARKER und RICHES 1993). *S. hermonthica* wird zwar als tropische Pflanze angesehen, in Äthiopien aber wurde sie auch schon bis in

Höhen von 2500 m gefunden (E. Kuiper, F. Reda und J. A. C. Verkleij<sup>1</sup>). Das Klima dort ist eher mediterran mit gelegentlichem Nachtfrost. Diese Beobachtung läßt vermuten, daß die in Äthiopien wachsenden *S. hermonthica*-Pflanzen an niedrigere Temperaturen angepaßt sind. Eine solch angepaßte Form ist vermutlich auch in der Lage, in Teilen Europas zu überleben – eine nicht zu unterschätzende Gefahr! *S. hermonthica* parasitiert nicht nur Getreide, sondern auch Wildgräser werden befallen: *Setaria incrassata*, *Sorghum arundinaceum*, *Sorghum sudanese*, *Rottboelia cochinchinensis*, *Eleusine indica*, *Paspalum scrobiculatum*, *Aristida*, *Brachiaria*, *Cymbopogon* und *Digitaria*.

*S. hermonthica*-Pflanzen (Abb. 1-2) sind behaart, ihr Sproß ist fasrig mit quadrangulärem Querschnitt. Die Pflanzen erreichen gewöhnlich eine Höhe von 30–40 cm, in Ausnahmefällen auch 100–150 cm. Die Blätter sind von lanzettenförmiger Gestalt mit einer Länge von 2,5–7,5 cm und einer Breite von bis zu 2 cm. Der lange Blütenstand umfaßt viele Blüten, von denen in der Regel sechs bis zehn geöffnet sind. Die Blütenfarbe variiert von lila bis rosarot, aber auch weiße Blütenblätter sind schon beobachtet worden (MUSSELMAN und HEPPER 1986, MOHAMED 1994). *S. hermonthica* ist strikt allogam (MUSSELMAN und PARKER 1982), die Bestäubung erfolgt über Insekten. Eine einzelne Pflanze produziert bis zu einer halben Million winziger Samen mit einer durchschnittlichen Länge von 0,45 mm (MUSSELMAN und PRESS 1995). Die Keimfähigkeit der Samen kann bis zu 20 Jahre betragen (DOGGETT 1988). Die hohe Zahl an Samen und deren lange Keimfähigkeit führen zu einer schnellen Anhäufung keimfähiger Samen im Boden. Dadurch steigt der Infektionsdruck auf dort angebaute Wirtspflanzen von Jahr zu Jahr.

### ***Striga senegalensis* Benth.**

Neuere Arbeiten erwähnten *S. senegalensis* Benth. als ein Synonym für *S. hermonthica* (HEPPER 1984, MUSSELMAN 1987, PARKER und RICHES 1993) oder verwendeten die Bezeichnung nicht mehr (MUSSELMAN und HEPPER 1986 und 1988, RAYNAL-ROQUES 1987, MOHAMED *et al.* 1996). Okonkwo benutzte in seinen frühen Arbeiten die Bezeichnung *S. senegalensis* und nannte als Synonym *S. hermonthica* (OKONKWO 1964, 1966a und 1966b). Später ging (auch) er zur alleinigen Bezeichnung *S. hermonthica* über (OKONKWO 1991 und 1996). HEMSLEY (1906) führte *S. senegalensis* dagegen als eigenständige Art auf.

---

<sup>1</sup> E. Kuiper, F. Reda und J. A. C. Verkleij, persönliche Beobachtung, Dept. of Ecology and Ecotoxicology of Plants, Vrije Universiteit Amsterdam, Amsterdam, Niederlande, veröffentlicht im Internet (1.4.2001) unter <http://www.bio.vu.nl/vakgroepen/plantecologie/weeds/species.html>



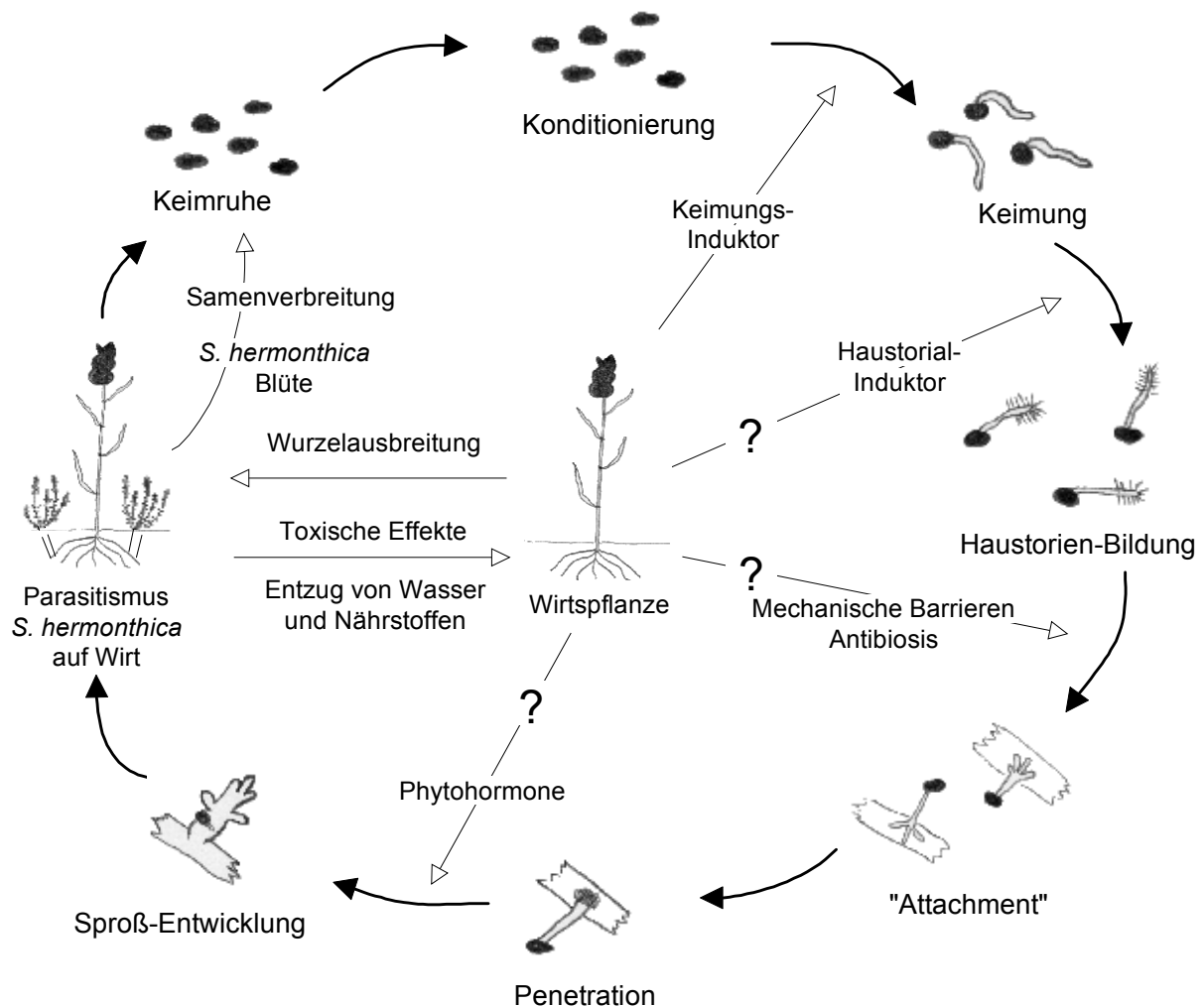
Abb. 1-2: *Striga hermonthica* (Del.) Benth.

- 1) starker Befall von *Sorghum bicolor* im Feld (Mali, 1995): blühende *S. hermonthica*-Pflanzen, dazwischen dürre Sorghum-Stengel,
- 2) *S. hermonthica* befällt *Sorghum bicolor*-Wurzel – Sproßentwicklung und Blattanlagen nach dem *Attachment* im *In vitro*-Versuch,
- 3) Blütenstand von *S. hermonthica* aus Kenia (Ernte 1994), Wirtspflanze: *Sorghum bicolor*-Varietät M-35-1 im Topfversuch (Gewächshaus, 1997)

Danach sollte es sich bei *S. senegalensis* um eine sehr eng mit *S. hermonthica* verwandte Form handeln, die sich, verglichen mit *S. hermonthica*, durch eine kleinere Blütenform auszeichnete. Weitergehende physiologische oder genetische Unterscheidungsmerkmale waren aber nicht bekannt. Für *S. senegalensis* wurden von Hemsley Herbarbelege aus dem Senegal, Gambia, Nigeria und Niger aufgeführt, für *S. hermonthica* Belege aus Äthiopien, Uganda und Arabien.

### 1.3.2 Lebenszyklus

Der Lebenszyklus von *Striga hermonthica* ist sehr komplex und an den ihrer Wirte angepaßt. Das folgende Schema (Abb. 1-3) veranschaulicht den Ablauf der Entwicklung vom Samen bis zur adulten Pflanze und die vielfältigen Interaktionen zwischen Parasit und Wirtspflanze. Die einzelnen Stadien und Beziehungen sollen dann im Anschluß näher erläutert werden. Bei deren Beschreibung werden auch Beobachtungen und Versuchsergebnisse verwendet, die nicht speziell für *S. hermonthica* gefunden worden sind, sondern für andere *Striga*-Arten. Die beschriebenen Sachverhalte lassen sich aber auch auf *S. hermonthica* übertragen.



#### Zeitlicher Ablauf:

Nach dem *Attachment*, der Penetration und dem Anschluß des Parasiten an das Gefäßsystem des Wirts dauert es rund fünf Wochen, bis oberirdische Pflanzenteile von *S. hermonthica* sichtbar werden. Zwei Wochen später beginnen die Pflanzen zu blühen. Nach der Bestäubung dauert es bis zur Samenreife zwei Wochen. Weitere zwei Wochen später werden die Samen freigesetzt.

Abb. 1-3: Lebenszyklus von *Striga hermonthica* – Wirt-Parasit-Wechselwirkungen.

### 1.3.2.1 Samenverbreitung

Bei der Verbreitung von *Striga*-Samen spielt der Wind keine entscheidende Rolle. Die Samen sind aber so winzig, daß sie an Saatgut, Kleidung, weidenden Tieren, Materialien, Geräten oder Fahrzeugen haftend, auch über weite Strecken von Feld zu Feld verschleppt werden können, ohne daß sich die Verantwortlichen dieses Umstands bewußt sind. Untersuchungen des auf lokalen Märkten in Nigeria angebotenen Saatguts von Sorghum, Kuhbohne, Mais und Millet zeigten in 64 % der Proben eine Kontamination mit *Striga*-Samen. Die am stärksten belasteten Proben enthielten mehr als 300 *Striga*-Samen pro 1–3 kg Saatgut (BERNER *et al.* 1994).

### 1.3.2.2 Keimruhe

Nach ihrer Verbreitung durchlaufen die Samen erst eine Phase der primären Keimruhe. In dieser Phase sind die Samen nicht keimfähig. Grund hierfür ist möglicherweise das Vorhandensein von Hemmstoffen in der Samenschale, in der darunterliegenden Aleuronschicht oder im Speichergewebe (Endosperm), die erst abgebaut werden müssen. Aus Untersuchungen an *Striga asiatica* kam EGLEY (1972) zum Schluß, daß vermutlich auch eine intakte Aleuronschicht die Entwicklung der Keimwurzel und damit die Keimung mechanisch verhindern kann. Bei *S. hermonthica* wurde meist eine mittlere Dauer von fünf bis sechs Monaten für die primäre Keimruhe ermittelt (GBEHOUNOU *et al.* 1996). Erst nach Ablauf dieser Nachreifezeit, der Zeitpunkt fällt dann (in Afrika) in etwa mit dem Ende der Trockenzeit zusammen, kann die Keimung induziert werden. Dieser Mechanismus verhindert eine vorzeitige Keimung bei ungünstigen Bedingungen: In der Trockenzeit gibt es zu wenig Wasser und keine Wirtspflanzen, die parasitiert werden könnten. Die Angaben für die minimale Dauer der primären Keimruhe variieren. So wurden Zeiträume von weniger als vier Monaten aber sogar auch von nur zwei Wochen beschrieben (KUIPER *et al.* 1996b). Die Dauer hängt auch von der jeweiligen Wirtspflanze ab, ob es sich z. B. um Pearl-Millet, Mais oder Sorghum handelt (GBEHOUNOU *et al.* 1996). Ob und wie die Keimruhe vorzeitig gebrochen werden kann, darüber gibt es in der Literatur widersprüchliche Angaben (SAUNDERS 1933, EGLEY 1972, PATTERSON 1987, WORSHAM 1987). FRENCH und SHERMAN (1976) beschrieben für *Aeginetia indica* aus der Familie *Orobanchaceae*, daß die Dormanz durch Behandlung mit Natriumhypochlorit gebrochen werden konnte.

### 1.3.2.3 Konditionierung

Mit dem Einsetzen der ersten Niederschläge in der nächsten Regenzeit nehmen die Samen Wasser auf und quellen. Doch in diesem Zustand können die Samen noch nicht keimen. Vor der Keimung müssen sie erst eine gewisse Zeit in feuchter Atmosphäre lagern. Diese Inkubation bezeichnet man als Konditionierung oder Vorkonditionierung (engl. *conditioning* oder *preconditioning*). Der Temperaturbereich, der für die Konditionierung geeignet ist, liegt bei 12–35 °C (VALLANCE 1950, AFLAKPUI *et al.* 1996). Für die Konditionierungsdauer schwanken die Angaben in der Literatur von einigen Tagen bis zu fünf Wochen (PATTERSON 1987, EJETA *et al.* 1993). Welche biochemischen Prozesse bei der Konditionierung genau stattfinden, ist noch nicht geklärt. Bei *Orobancha crenata* fand man eine Erhöhung der Gibberellinsäure (GA<sub>3</sub>)-Aktivität während der Konditionierung um das 10fache (BERGMANN 1992). Desweiteren werden vor allem noch folgende drei Thesen diskutiert: a) Es werden Inhibitoren der Keimung ausgewaschen, b) zur Keimung nötige Cofaktoren und Substrate werden gebildet oder c) die Permeabilität der Samenstruktur (möglicherweise der Aleuronschicht) wird erhöht (WORSHAM 1987). Überlange Konditionierung (10–14 Wochen) führt von der Verminderung bis zum völligen Verlust der Keimfähigkeit: Man spricht von feuchter Keimruhe (engl. *wet dormancy*) oder sekundärer Keimruhe (VALLANCE 1951, PIETERSE *et al.* 1984).

### 1.3.2.4 Keimung

Die Keimung von *Striga hermonthica* wird durch einen chemischen Stimulus ausgelöst. Mehrere Stoffe sind als Keimungsstimulantien bekannt (Abb. 1-4). Natürliche Keimungsstimulantien werden von den Wurzeln verschiedener Pflanzen abgegeben. Möglicherweise werden aber Stoffe auch erst im Boden, z. B. durch Mikroorganismen in der Rhizosphäre, in keimungsinduzierende Formen umgewandelt oder in ihrer Aktivität verändert (WEGMANN 1996). 1966 identifizierten Cook *et al.* das erste natürliche Keimungsstimulans: Strigol, abgegeben vom Nicht-Wirt Baumwolle (*Gossypium hirsutum*) (COOK *et al.* 1966). Strigol, eine Sesquiterpenverbindung, induziert die Keimung von *S. hermonthica* schon bei einer Konzentration von 10<sup>-15</sup> M. 1973 wurde die Röntgenstruktur bestimmt (COGGON *et al.* 1973). Später fand man Strigol u. a. auch bei den Wirten Sorghum und Proso-Millet (*Panicum miliaceum*). In der Folge wurden weitere keimungsinduzierende Stoffe identifiziert: Sorgolacton wurde von *Sorghum bicolor*-Wurzeln isoliert. Alectrol, ein strukturverwandter Stoff des Strigols, wird von der Kuhbohne ausgeschieden und induziert die Keimung von

*Alectra vogelii* sowie unter den *Striga*-Arten zumindest die Keimung von *S. hermonthica* und *S. gesneroides* (MÜLLER *et al.* 1992).

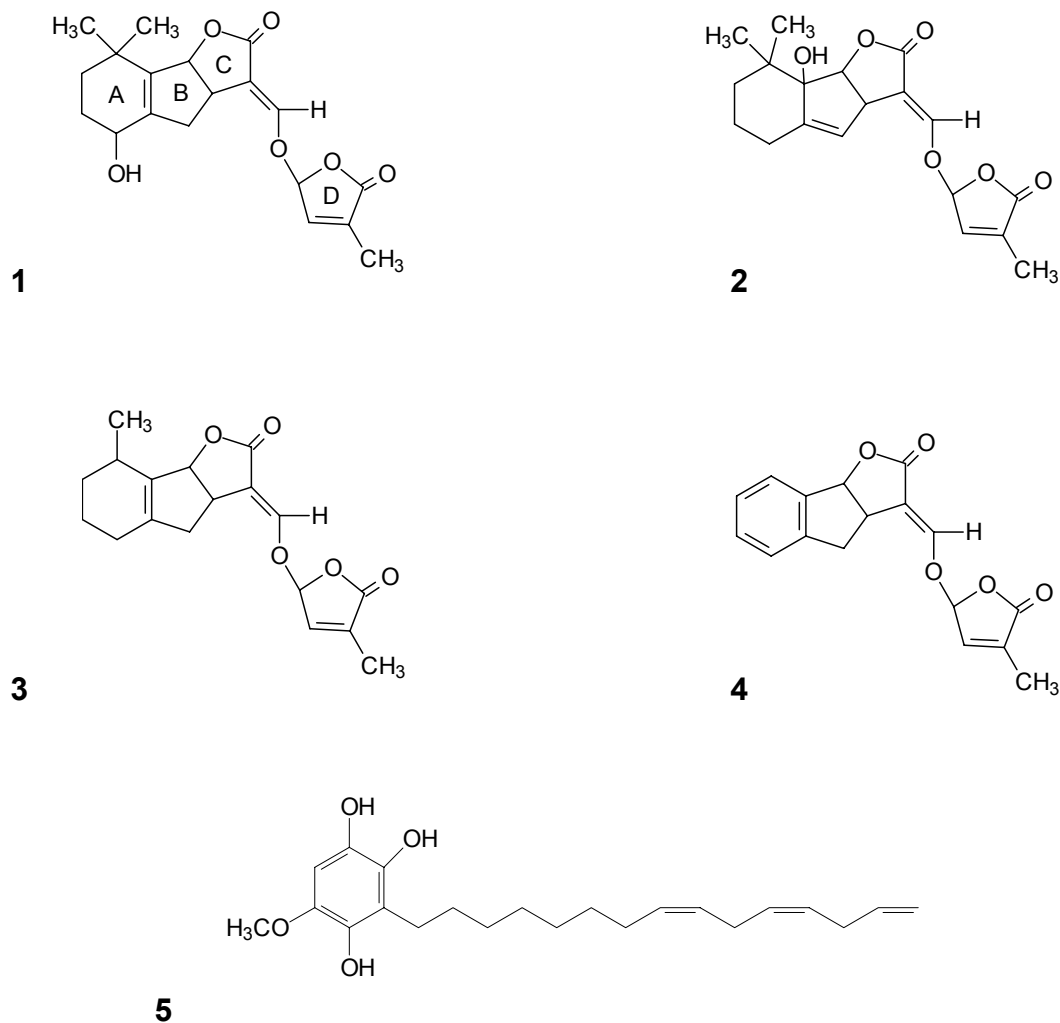


Abb. 1-4: Molekülstrukturen verschiedener Keimungsstimulantien von *Striga* spp.  
**1)** Strigol, **2)** Alectrol, **3)** Sorgolacton, **4)** GR 24 und **5)** Dihydrochinon des Sorgoleon

Darüber hinaus wurden auch noch andere Strigol-Analoga mit keimungsinduzierender Wirkung gefunden. Die gesamte Gruppe dieser Stoffe wird als Strigolactone bezeichnet (BUTLER 1995). Ein Jahr nach der ersten Röntgenstruktur gelang 1974 zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander die Totalsynthese von Strigol (HEATHER *et al.* 1974, MACALPINE *et al.* 1974). Neben Strigol wurden auch viele verwandte Moleküle mit keimungsinduzierender Wirkung synthetisiert. Diese Gruppe von Stoffen wird auch als GR-Substanzen bezeichnet. Woher die Bezeichnung „GR“ stammt, darüber gibt es unterschiedliche Meinungen: a) GR steht für *Germination Regulator* (engl.), also Keimungsregulator, b) für *Germination Releaser* (engl.), Keimungsauslöser, oder aber c) es sind die Anfangsbuchstaben des mit der Entwicklung beschäftigten Chemikers Dr. G. Rosebery (JOHNSON *et al.* 1976). Die höchste

Aktivität besitzen GR 7 und GR 24. GR 24 wurde 1981 zum ersten Mal synthetisiert (JOHNSON *et al.* 1981) und dient in vielen Untersuchungen als Standard für die Keimungsinduktion. GR 24 wird als Racemat von vier Stereoisomeren hergestellt. Nur das Stereoisomer mit der gleichen stereochemischen Konfiguration wie Strigol und Sorgolacton hat die hohe keimungsinduzierende Wirkung in der Größenordnung von Strigol. Zu einer anderen Gruppe keimungsinduzierender Stoffe gehört das Sorgoleon (CHANG *et al.* 1986). Sorgoleon wird u. a. von Sorghum produziert. Seine keimungsinduzierende Wirkung liegt eine Größenordnung unter der des Strigols. Darüber hinaus ist es weit weniger stabil als Strigol und kaum wasserlöslich. Sorgoleon wird unter den Keimungsstimulantien nur eine Nebenrolle zugeschrieben (BUTLER 1995). Das Haupt-Keimungsstimulans bei Sorghum ist Sorgolacton (HAUCK *et al.* 1992). Strigol ist das Haupt-Keimungsstimulans bei Mais und Proso-Millet sowie von nachgeordneter Bedeutung bei Sorghum (SIAME *et al.* 1993). Die Aktivitäten der von verschiedenen Sorghum-Varietäten abgegebenen Keimungsstimulantien, d. h. deren Fähigkeit zur Keimungsinduktion, variieren um das  $10^8$ -fache (WEERASURIYA *et al.* 1993). Die o. g. Keimungsstimulantien sind nur die mit den mengenmäßig bedeutendsten Anteilen in den Exsudaten. Viele Pflanzen produzieren jedoch eine Kombination – ein ganzes Bouquet an verschiedenen Keimungsstimulantien in unterschiedlichen Mengen. WOLLENBERG (1998) fand Hinweise darauf, daß verschiedene Sorghum-Varietäten keimungsinduzierende Stoffe abgeben, die sich in ihrem Laufverhalten in der Dünnschichtchromatographie unterscheiden. Welcher Teil der Wurzeln einer Wirtspflanze die Keimungsstimulantien produziert, ist unklar. REDA *et al.* (1994) fanden für Mais, daß die älteren Wurzelbereiche die größte Menge an Stimulantien produzierten und daß die Fähigkeit zur Wurzelspitze hin abnahm. Dagegen ermittelte OKONKWO (1991) das Gegenteil: Hier produzierten hauptsächlich die jüngeren Wurzeln Keimungsstimulantien. Neben den in Wirtswurzelexsudaten gefundenen Stoffen gibt es noch eine ganze Reihe von Substanzen, die in der Lage sind, die Keimung von *S. hermonthica* zu induzieren. Sie müssen allerdings in wesentlich höheren Konzentrationen eingesetzt werden. Beispiele sind Thioharnstoff und Allylthioharnstoff (BROWN und EDWARDS 1945), Cytokinine wie Kinetin und Zeatin (YOSHIKAWA *et al.* 1978), Thidiazuron (N-phenyl-N'1,2,3-thidiazol-5-yl-urea mit Cytokinin-ähnlicher Wirkung) (BABIKER *et al.* 1992, LOGAN und STEWART 1995), Coumarin-Derivate (WORSHAM *et al.* 1959), Jasmonat (YONEYAMA *et al.* 1998) und Natriumhypochlorit (HSAIO *et al.* 1981). Gibberellinsäure wirkt bei verschiedenen *Striga*-Arten unterschiedlich: GA<sub>3</sub> induziert z. B. die Keimung von *S. angustifolia* (WORSHAM 1987), die von *S. asiatica* aber erst nach Verletzen der Samenschale (HSAIO *et al.* 1988). Über den Wirkmechanismus der



Stimulantien ist wenig bekannt. Im Fall der Strigolactone werden als für die Stimulierung wichtige Strukturen die  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Vinyletherbindung und der D-Ring beschrieben, und es wird folgender molekularer Mechanismus vorgeschlagen (NEFKENS *et al.* 1997): Das Nucleophil eines Proteinrezeptors addiert an die Vinyletherbindung des Stimulans. Dies führt zum Bruch der Vinyletherbindung und zur Eliminierung des D-Rings. Das verbleibende Ringsystem (ABC) ist dann kovalent an den Rezeptor gebunden. Diese Konformation ist dann der mögliche Start einer Signalübertragungskette. BOONE *et al.* (1995) stellten dagegen die These auf, daß nur der D-Ring für die Induktion wichtig wäre. Zu diesem Schluß kamen sie durch den Vergleich der Strukturen des D-Rings von Strigol mit dem Dihydrochinon des Sorgoleon. Dieser Ansicht widersprachen aber WIGCHERT und ZWANENBURG (1999), die die mechanistische Übereinstimmung als nicht gegeben ansahen. Ethylen und Ethylengeneratoren wie Ethephon (2-Chlorethanphosphonsäure, engl. *2-chloroethyl-phosphonic acid*, CEPA) induzieren die Keimung von *Striga* (EGLEY und DALE 1970, CHANCELLOR *et al.* 1971, EPLEE 1975), nicht aber die von *Orobanch*e (EDWARDS *et al.* 1976). Darüber hinaus wird Ethylen auch bei der Stimulierung durch Strigol (BABIKER *et al.* 1993), Sorghum-Wurzelexsudate und GR 24 (JACKSON und PARKER 1991, LOGAN und STEWART 1991) von *S. hermonthica* endogen gebildet. Umstritten bleibt, ob Ethylen Teil einer Signalübertragungskette nach der Stimulierung ist, was verschiedene Autoren favorisieren (PARKER und RICHES 1993), ob es nur ein Keimungsstimulans unter anderen ist oder gar nur als Nebenprodukt bei der Keimung anfällt.

Nach der Definition der *International Seed Testing Association* (ISTA) gilt die Keimung als abgeschlossen, wenn alle für die weitere Entwicklung nötigen Strukturen vollständig vorhanden sind und sich unter günstigen Bedingungen eine Pflanze entwickeln kann. Davon abweichend spricht man bei der Keimung parasitischer Pflanzen in Anlehnung an die Mykologie bereits dann von „gekeimt“, wenn die Keimwurzel (früher auch als „Keimschlauch“ bezeichnet) aus der Samenschale ausgetreten ist (BISCHOF und KOCH 1973, SAHAI und SHIVANNA 1982). Bei der Ausbildung der Keimwurzel kommt es zunächst zum Anschwellen der Mikropylarregion des Samens und dann zum Austritt eines fadenförmigen Komplexes langgestreckter Zellen. Die Keimung tritt bei *Striga* meist innerhalb 24 Stunden nach dem Stimulus ein. Von Spontankeimung ohne Induktion wurde in der Literatur berichtet (VALLANCE 1950, KUST 1963, HSIAO *et al.* 1979, FISCHER 1997). Die Angaben zur optimalen Keimungstemperatur schwanken zwischen 25 und 35 °C, die Bandbreite der möglichen Keimungstemperaturen reicht von 20 bis 40 °C (PARKER und RICHES 1993, AFLAKPUI *et al.*

1996). Licht inhibiert die Keimung zumindest von *S. asiatica*, möglicherweise unter Vermittlung des Phytochromsystems (EGLEY 1972). Alkalische Bedingungen hemmen die Keimung von *Striga*. Grund hierfür ist eventuell die Inaktivierung der Keimungsstimulantien unter diesen pH-Bedingungen (BROWN *et al.* 1949).

Neben Keimungsstimulantien wird auch die Existenz von Keimungsinhibitoren diskutiert. Stoffe mit inhibitorischer Wirkung wurden bereits aus Wurzelexsudaten von Sorghum-Varietäten isoliert (WEERASURIYA *et al.* 1993). Über deren Struktur ist allerdings nichts bekannt. Keimungsinhibition kann auch die Folge zu hoher Konzentrationen eines Keimungsstimulans sein: Durch die hohe Konzentration des Stimulans wird das Elongationswachstum der Keimwurzel gehemmt, und das sichtbare Merkmal der Keimung fehlt. Neben künstlichen Keimungsstimulantien könnten ebenso auch Keimungsinhibitoren (natürliche wie künstliche) eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von *Striga* spielen.

#### 1.3.2.5 Haustorium

Nach der Keimung ist *Striga hermonthica* darauf angewiesen, möglichst schnell den Kontakt zu einer Wirtswurzel herzustellen. Die Meristemzellen der Keimwurzel zeigen ein longitudinales Streckungswachstum, um in die Nähe einer Wirtswurzel zu gelangen (SMITH *et al.* 1990). Dabei kann die Keimwurzel eine Länge von 5–10 mm erreichen. Ob die Wachstumsrichtung einem Chemotropismus unterliegt, ist unklar (PEARSON 1913, DIXON und PARKER 1984, RIOPEL *et al.* 1986). Der nächste Schritt ist die Ausbildung eines speziellen Organs für die Wasser- und Nährstoffaufnahme vom Wirt an der Spitze der Keimwurzel: die Bildung des primären Haustoriums. Das Haustorium bildet die morphologische und physiologische Brücke zwischen beiden Pflanzen (RIOPEL und TIMKO 1995). Diese Vorgänge müssen in kürzester Zeit, längstens wenige Tage nach der Keimung ablaufen, da der Samen nur begrenzte Ressourcen bevorratet und der Keimling ansonsten abstirbt. Als Merkmale der Haustorienbildung gelten: Einstellen des Streckungswachstums, dafür radiales Wachstum der corticalen Zellen an der Spitze und damit Verbreiterung der Spitze. Diese corticalen Zellen des Apex werden auch als Papillenzellen und die verdickte Spitze der Keimwurzel in Anlehnung an die mykologische Terminologie als *Appressorium* bezeichnet. Desweiteren kommt es zur Ausbildung von Härchen auf der Epidermis, besonders im vorderen Bereich der Keimwurzel (NICKRENT *et al.* 1979, RIOPEL *et al.* 1986, SMITH *et al.* 1990). Die Härchen sind mit einem klebrigen, hemicelluloseartigen Stoff bedeckt, der als eine Art Klebstoff zwischen

Haustorium und Wirtswurzel dient. Den Kontakt mit einer Wirtswurzel bezeichnet man mit dem englischen Begriff *Attachment*. Bei einem erfolgreichen Befall schließt daran die Penetration des Haustoriums in die Wirtswurzel an. Dabei spielen Exoenzyme eine entscheidende Rolle, ähnlich wie bei der Infektion mit pathogenen Pilzen. Daß Phytoparasiten in der Lage sind, zellwand-abbauende Enzyme abzugeben, zeigten SHOMER-ILAN (1993 und 1994) für *Orobancha aegyptiaca*, BROOKS (1995), BAUMANN (1996) und BÄCKER (1997) für *S. hermonthica*. So wurden im Exsudat von *S. hermonthica*-Keimwurzeln u. a. folgende Enzyme nachgewiesen: Exocellulase (EC 3.2.1.91), Endocellulase (EC 3.2.1.4), Endoxylanase (EC 3.2.1.8), Pektatlyase (EC 4.2.2.2), Polygalacturonase (EC 3.2.1.15), Pektinmethylesterase (EC 3.1.1.11) und Pektinlyase (EC 4.2.2.10). Auch Peroxidase-Aktivität konnte nachgewiesen werden (Fe-Peroxidase, EC 1.11.1.7). Diese Daten passen zur gängigen Vorstellung, daß die Keimwurzel im Gewebe des Wirts zuerst entlang der Mittellamelle vordringt. Dazu sind pektolytische Enzyme vonnöten, u. a. Polygalacturonasen (für *Orobancha* gezeigt: JOEL und LOSNER-GOSHEN 1994). Erst am Zentralzylinder sind Cellulasen zum Abbau der Primärwand erforderlich. Xylanasen können mit Cellulose assoziierte Xyloglucane abbauen. Das Haustorium von *Striga* etabliert nur eine Verbindung zum Xylem, wie elektronenmikroskopische Aufnahmen bewiesen haben (DÖRR 1997). Im Gegensatz dazu etabliert *Orobancha* eine Verbindung sowohl zum Xylem als auch zum Phloem, wobei letztere stärker ausgeprägt ist (PIETERSE 1979, PIETERSE und PESCH 1983). Dies liegt wohl darin begründet, daß *Orobancha* als nicht-grüner Holoparasit gänzlich auf die Kohlenstoffversorgung durch den Wirt angewiesen ist im Gegensatz zum grünen Hemiparasiten *Striga* mit eigener Photosynthese. Um die Kontaktzone herum kommt es zum Dickenwachstum der Zellen und zur Ausbildung des Anschlußorgans, für das man neben der Bezeichnung als Haustorium auch den Begriff Tuberkel findet. Das voll ausgebildete Haustorium besteht aus drei Elementen: dem zentralen Gefäßkörper mit dem Xylem, dem Hyalinkörper mit angrenzendem Phloem und dem Endophyten, dem Teil des Haustoriums im Inneren der Wirtswurzel. Nach dem Anschluß an das Gefäßsystem des Wirts setzt die Sproßbildung ein, und es werden Adventivwurzeln an den unterirdischen Nodien gebildet (BA 1978, MUSSELMAN 1980). Ist das primäre Haustorium etabliert, kann es in der Folge auch zur Ausbildung von weiteren Haustorien, sogenannten sekundären Haustorien kommen (PARKER und RICHES 1993). Sekundäre Haustorien haben Anschluß an die Wurzeln des gleichen Wirts wie das primäre Haustorium, oder aber der Kontakt besteht zu anderen Pflanzen – Wirten oder auch Nicht-Wirten. Unklar ist, ob diese sekundären Haustorien funktional wichtig sind für die Versorgung (MUSSELMAN 1980). In der Literatur geht man davon aus, daß ähnlich wie

bei der Keimung auch zur Einleitung der Haustorienbildung ein Stimulus erforderlich ist (RIOPEL und MUSSELMAN 1979, SMITH *et al.* 1990). Als Haustorialinduktoren werden phenolische Substanzen beschrieben, aber auch Cytokinine hätten die Fähigkeit zur Induktion (BABIKER *et al.* 1992). Als Haustorialinduktor u. a. von *S. asiatica* konnte 2,6-Dimethoxy-p-benzochinon (engl. *2,6-dimethoxy-benzoquinone*, 2,6-DMBQ) identifiziert werden (CHANG und LYNN 1986, RIOPEL *et al.* 1986). 2,6-DMBQ wird aber wohl nicht direkt von Wurzeln der Wirtspflanzen abgegeben, vielmehr ist wahrscheinlich, daß Umsetzungs- und Abbauprozesse vorliegen könnten, die zu 2,6-DMBQ führen. Benzochinone und Phenole sind häufig auftretende Intermediate im Phenylpropanstoffwechsel und bei der Lignifizierung. Eine ubiquitär auftretende Verbindung, die Syringasäure, kann durch milde Oxidation mit Peroxidasen in 2,6-DMBQ umgewandelt werden (FRICK 1996, FRICK *et al.* 1996). Peroxidase-Aktivität konnte in Exsudaten von *S. hermonthica*-Keimwurzeln nachgewiesen werden (s. o.).

#### 1.3.2.6 Vegetatives Wachstum

Nach der Etablierung des Kontaktes zwischen Parasit und Wirt beginnt die Sproßentwicklung von *Striga hermonthica*. Möglicherweise interagieren Parasit und Wirt auch über Wachstumsfaktoren und Phytohormone miteinander. Der Chlorophyllgehalt im Gewebe des Hemiparasiten *Striga* beträgt nur 25–50 %, verglichen mit nicht-parasitischen Pflanzen (STEWART 1987). Daher ist *S. hermonthica* darauf angewiesen, einen großen Anteil der Kohlenstoffverbindungen vom Wirt zu beziehen. Die Literaturangaben für den Kohlenstoff (C)-Bezug vom Wirt liegen bei 28–43 % des Kohlenstoffs (PRESS *et al.* 1987, GRAVES *et al.* 1989). WEBER (1993) berichtete sogar von Messungen bei *Striga* auf verschiedenen Hirsen, die ergaben, daß 38–85 % des gesamten Kohlenstoffs vom Wirt stammen würden. Die Bestimmung des Anteils kann über  $^{14}\text{C}$ -Markierungsstudien erfolgen. Eine andere Methode macht sich das Verhältnis der beiden natürlichen Kohlenstoffisotope  $^{12}\text{C}$  und  $^{13}\text{C}$  im Pflanzengewebe zunutze. C3-Pflanzen (*Striga*) und C4-Pflanzen (Sorghum) fixieren Kohlenstoff aus  $\text{CO}_2$  primär auf unterschiedlichen Wegen. Die zur  $\text{CO}_2$ -Fixierung verwendeten Enzyme haben eine unterschiedliche Präferenz für die Substrate  $^{12}\text{CO}_2$  und  $^{13}\text{CO}_2$  – man spricht von Isotopendiskriminierung. C3-Pflanzen fixieren  $\text{CO}_2$  über die Ribulosebisphosphatcarboxylase mit einer hohen Präferenz für  $^{12}\text{CO}_2$ , C4-Pflanzen dagegen benutzen die Phosphoenolpyruvatcarboxylase, die weniger isotopenspezifisch arbeitet. Aufgrund des Isotopenverhältnisses im Gewebe von *S. hermonthica* kann so der Kohlenstoff-

Bezug vom (C4-) Wirt berechnet werden.

#### 1.3.2.7 Auswirkungen auf den Wirt

Der Befall mit *S. hermonthica* führt bei den Wirtspflanzen zu reduziertem Wachstum (geringere Höhe, reduzierte Blattfläche), Welke, Chlorosis der Blätter und reduziertem Ertrag. Das Verhältnis von Sproß zu Wurzel wird besonders bei Getreide klein. Durch die geringere Blattfläche und den niedrigeren Wuchs (stärkere Selbstbeschattung) kommt es zu einer verringerten Netto-Assimilationsrate. Ebenso steigt der C-Verlust durch Respiration. Die Photosyntheserate wird stark reduziert, sie beträgt weniger als 50 % verglichen mit nicht-infizierten Pflanzen (GURNEY *et al.* 1995, FROST *et al.* 1997). Als Grund für diese Symptome wird die Existenz eines Toxins diskutiert, mit dem *Striga* ihren Wirt „vergiften“ könnte (MUSSELMAN 1980, PARKER 1984, PRESS *et al.* 1990, EJETA *et al.* 1993). Die Phänomene könnten aber auch durch die Annahme einer Wasserstreßsituation, hervorgerufen durch *Striga*, erklärt werden (WEGMANN 1996). Die Spaltöffnungen von *Striga* reagieren nur schwach auf Abscisinsäure (engl. *abscisic acid*, ABA) und sind daher fast immer geöffnet (SHAH *et al.* 1987, SMITH und STEWART 1990). Daraus resultiert eine Transpirationsrate, die z. T. mehr als das fünffache derer des Wirts beträgt. Durch die exzessive Transpiration von *Striga* kommt es zu einem ständigen Substanzfluß vom Wirt zum Parasiten (engl. *sink*) und zum Wassermangel in den Wirtswurzeln. Der Wassermangel oder ein Verwundungssignal hervorgerufen durch das Haustorium könnten die Produktion von ABA in den Wirtswurzeln bewirken. Das ABA-Signal löst beim Wirt das Schließen der Stomata aus und führt so zu einer verminderten Photosyntheserate. In der Folge werden dann Seneszenzerscheinungen deutlich (TAYLOR *et al.* 1996). Hohe ABA-Konzentrationen haben bei Sorghum auch den Verlust der Samenanlagen zur Folge. Eine weitere Ursache für die Wirtssymptome könnte auch der Einfluß von *Striga* auf die hormonelle Balance des Wirts sein (DRENNAN und EL HIWERIS 1979).

### 1.3.3 Kontrolle von *Striga hermonthica*

Mit unterschiedlichen Ansätzen wird derzeit versucht, den Befall durch *Striga hermonthica* einzudämmen, die negativen Folgen zu minimieren und die weitere Ausbreitung zu stoppen. Die Bekämpfungsmaßnahmen lassen sich in sechs Hauptgruppen einteilen:

1. Mechanische Kontrolle,
2. Chemische Kontrolle,
3. Physikalische Kontrolle,
4. Biologische Kontrolle,
5. Integrierter Anbau,
6. Resistenzzüchtung.

#### 1.3.3.1 Mechanische Kontrolle

Hacken und Jäten können bei leichtem Befall oder bei Erstbefall das Auftreten von *Striga* eindämmen und die Anhäufung von Samen im Boden verhindern (DOGGETT 1984). Später können die Maßnahmen die weitere Ausbreitung von *Striga* einschränken und bei den Wirtspflanzen den Nährstoff- und Wasserentzug verursacht durch *Striga* mindern. Die Auswirkungen des unterirdischen Befalls, also bevor *Striga*-Pflanzen überhaupt oberirdisch sichtbar werden, wie z. B. die Störung der Entwicklung der Wirtspflanzen, lassen sich damit nicht verhindern.

#### 1.3.3.2 Chemische Kontrolle

Bodendesinfektionsmittel wie Methylbromid sind im Einsatz gegen *Striga* äußerst effizient. Doch ihre Anwendung, z. B. die nötige gasdichte Abdeckung der Behandlungsfläche, ist kompliziert und aufwendig, und sie hat die Vernichtung aller im Anwendungsbereich befindlichen Bodenorganismen zur Folge (EPLÉE und LANGSTON 1971). Auch verschiedene Herbizide, wie z. B. 2,4-D (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, Auxin-Typ), Dicamba, Paraquat, Trifluralin und Glyphosat, zeigten gewisse Erfolge (EPLÉE und NORRIS 1995). Doch nicht jede Anwendung ist erfolgreich: So konnte durch den Einsatz des Herbizids 2,4-D auf Feldern von Kleinbauern in Cinzana, Mali (Westafrika) keine Verbesserung der Situation erzielt

werden<sup>2</sup>. Auch sind unerwünschte Auswirkungen auf die Bodenorganismen möglich, falls die Herbizide (verstärkt) in den Boden gelangen. Antitranspirantien verringern die Transpirationsrate der Pflanzen. Da *Striga* im Gegensatz zu Sorghum eine sehr hohe Transpirationsrate zur Kühlung benötigt, führte in Gewächshausversuchen der Einsatz von Antitranspirantien schnell zum Hitzestreß und schließlich zum Hitzetod von *S. hermonthica* (PRESS *et al.* 1989). In den USA wird eine sehr aufwendige Bekämpfungsstrategie gegen *S. asiatica* angewandt. Ethylen, ein gasförmiges Keimungsstimulans (siehe Kap. 1.3.2.4), wird in den Boden geleitet und führt zur Suizidkeimung der Samen. Suizidkeimung heißt: *Striga* keimt aus – die Keimlinge sterben aber ab, da kein Wirt in der Nähe ist, der befallen werden kann (EPLLEE 1975, EGLEY *et al.* 1990). Darüber hinaus wird die Idee diskutiert, weitere künstlich hergestellte Keimungsstimulantien im Feld auszubringen, die eine Suizidkeimung von *Striga* bewirken könnten (JOHNSON *et al.* 1976). Doch die meisten synthetischen Keimungsstimulantien sind dafür zu instabil. Und selbst für die chemisch am leichtesten zu synthetisierenden Stoffe, wie etwa GR 24, sind Aufwand und Kosten noch so hoch, daß an ein flächendeckendes Programm nicht einmal in Ansätzen zu denken ist. Durch die Gabe von Stickstoffdünger kann der Befall durch *S. hermonthica* verringert werden (VERKLEIJ *et al.* 1994). Ammonium-Stickstoff hat einen direkten negativen Effekt auf die Entwicklung von *Striga*, Nitrat-Stickstoff dagegen nicht. Ammonium-Stickstoff und in geringerem Maße Nitrat-Stickstoff hemmen die Produktion von Keimungsstimulantien bei Sorghum (PIETERSE 1996). Dem Einsatz von Bodendesinfektionsmitteln, Herbiziden, Ethylen und Dünger ist eines gemein, sie übersteigen bei weitem die finanziellen Möglichkeiten von Kleinbauern in Afrika.

#### 1.3.3.3 Physikalische Kontrolle

Bei der Solarisation werden die Felder mit einer Plastikfolie abgedeckt und die Seiten verschlossen, so daß ein Treibhauseffekt entsteht. Bei genügender Sonneneinstrahlung steigt die Temperatur in den oberen 5–10 cm des Bodens auf 50–60 °C. Diese Temperatur ist für die Parasitensamen letal, vor allem wenn sie feucht sind. Nach 4–6 Wochen Behandlung wird eine signifikante Reduktion der Samenzahl von *Striga* (EPLLEE *et al.* 1984) und *Orobanche* (LINKE *et al.* 1988) erzielt.

---

<sup>2</sup> persönliche Beobachtung, Cinzana, Mali, Westafrika, 1995.

#### 1.3.3.4 Biologische Kontrolle

Der Einsatz von *Striga*-Pathogenen wird im Rahmen einer biologischen Kontrolle diskutiert. Als „Gegenspieler“ von *Striga* kommen Pilze und Insekten in Frage. Bei den Pilzen wurden vor allem Vertreter der Gattung *Fusarium* untersucht: *F. oxysporum*, *F. nygamai* und *F. solani* hemmten die Keimung von *S. hermonthica* (ABBASHER *et al.* 1996, CIOTOLA *et al.* 1996, SAVARD *et al.* 1997). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, daß *F. nygamai* Samen von *S. hermonthica* penetriert und in ihnen sporuliert hat. Dies führte zur Zerstörung der Samen. Auch die Produktion von Phytotoxinen durch *Fusarium* spp. wurde beschrieben (ABBASHER 1994). Verschiedene Insekten, die Antagonisten von *Striga* sind, wurden bereits identifiziert. Doch die meisten Arten befallen auch Feldfrüchte. Als mögliche Kandidaten für eine biologische Kontrolle kommen eventuell *Smicronyx* spp., *Junonia orithya* und *Stenoptilodes taprobanes* in Betracht (BASHIR und MUSSELMAN 1984). Larven der Käfer *Smicronyx* spp. ernähren sich von den Samenkapseln von *S. hermonthica* und verhindern so die Samenproduktion. Larven des Schmetterlings *J. orithya* fressen Blätter und Blüten von *S. hermonthica* (JOST *et al.* 1996). Verschiedene Autoren schlugen den Einsatz von Mikroorganismen vor. Aus dem Boden von Sorghum-Feldern isolierte Stämme des Bakteriums *Azospirillum brasilense* verringerten in *In vitro*-Tests die Keimung von *Striga*-Samen und hatten darüber hinaus einen wachstumsfördernden Effekt auf Sorghum (BOUILLANT *et al.* 1996). Das Bakterium *Pseudomonas syringae* pathovar *glycinea* induzierte die (Suizid-) Keimung von *Striga*-Samen durch die Abgabe von Ethylen (BERNER *et al.* 1999). Alle diese biologischen Kontrollmaßnahmen bergen die Gefahr in sich, daß die massive Freisetzung von Organismen auch schädliche und eventuell unkontrollierbare Effekte mit sich bringen könnte.

#### 1.3.3.5 Integrierter Anbau

Sehr erfolgreich bei der Kontrolle von *Striga* ist der integrierte Anbau (PARKER und RICHES 1993). Bei der Rotation oder Fruchtfolge werden *Trap-crops* (engl., Fallenpflanzen) oder *Catch-crops* (engl.) eingesetzt. *Trap-crops*, auch als *Falsche-Wirte* bezeichnet, induzieren die Keimung des Parasiten, werden aber selbst nicht befallen. Die Keimlinge sterben schließlich ab – auch hier handelt es sich um Suizidkeimung. So wird die Zahl der Samen im Boden verringert. Beispiele für Falsche-Wirte sind Baumwolle, Sojabohne, Sonnenblume und (resistente) Kuhbohne. *Catch-crops* sind Wirtspflanzen, auf denen sich der Parasit normal entwickeln kann, wie z. B. Sudangrass (*Sorghum sudanese*). *Catch-crops* und



Parasitenpflanzen müssen vor der Samenreife des Parasiten vom Feld entfernt werden. Einen Kornsertrag bringen die *Catch-crops* damit nicht, eventuell kann man die Pflanzen als Viehfutter verwenden. Wenn man *Catch-crops* zur normalen Saison anbaut, ist das unwirtschaftlich. In manchen Regionen aber ist der Anbau bei kurzen Regenfällen, die für den normalen Anbau nicht ausreichen, möglich. Eine andere Methode ist das sogenannte *Intercropping* (engl.). Auf einem Feld werden in Reihen nebeneinander Wirtspflanzen und Falsche-Wirte, vorwiegend Leguminosen, gepflanzt. Ein gutes Beispiel hierfür ist der gemeinsame Anbau von Sorghum und resistenter Kuhbohne. Die Kuhbohne induziert in ihren Anbaureihen die Keimung, kann aber nicht befallen werden. Ein weiterer positiver Effekt ist das Einbringen von Stickstoff in den Boden durch die Stickstoff-fixierende Wirkung der Leguminosen, was auch zur Reduktion der Zahl an *Striga*-Pflanzen beiträgt (REDDY *et al.* 1994). Darüber hinaus kommt es zu einer breiten, bodennahen Ausbreitung der Kuhbohne auf dem Feld. Durch den dichten Bewuchs des Bodens ist das Heranwachsen von *Striga*-Pflanzen, die den Anschluß an einen Wirt etablieren konnten, stark gehemmt<sup>3</sup>. So können sich die Wirtspflanzen gut entwickeln. Der absolute Ertrag ist durch die geringere Anbaufläche zugunsten des Falschen-Wirts zwar reduziert, doch der zusätzliche Ertrag des Falschen-Wirts bietet einen gewissen Ausgleich. Eine weitere alternative Anbaumethode ist das sogenannte *Transplanting* (engl.). Dabei werden Sorghum-Sämlinge erst auf *Striga*-freien Feldern vorgezogen und dann auf infizierte Felder pikiert oder „transplantiert“. Dadurch erhalten die Sorghum-Pflanzen einen Entwicklungsvorsprung gegenüber *Striga*. Hieraus resultiert ein kräftigeres Wachstum der Sorghum-Pflanzen und ein höherer Ertrag (DAWOUD *et al.* 1996). Beide Anbaumethoden sind für die Bauern problemlos durchführbar. Die Methoden bedürfen keiner komplizierten Techniken, und es fallen keine Kosten für Dünger oder Chemikalien an.

#### 1.3.3.6 Resistenzzüchtung

Die Züchtung *Striga*-resistenter Pflanzen ist, falls es gelingt solche Pflanzen herzustellen, langfristig gesehen die erfolgversprechendste Methode zur Kontrolle von *Striga*. Doch was heißt eigentlich resistent? Als erstes soll hier die Terminologie für die verschiedenen möglichen Genotypen geklärt werden (WEGMANN 1996):

---

<sup>3</sup> persönliche Beobachtung, Mali, Westafrika, 1995.

- **suszeptibel:**  
ein Genotyp, der von *Striga* befallen wird und Parasitenpflanzen zum Auflaufen bringt. Der Ertrag ist bei Befall (deutlich) reduziert, bis zum Totalausfall.
- **tolerant:**  
ein Genotyp, der gleich viele *Striga*-Pflanzen wie ein suszeptibler zum Auflaufen bringt, dessen Ertrag aber nicht oder gering(er) reduziert ist.
- **resistent:**  
ein Genotyp, der in einem *Striga*-infizierten Feld keine *Striga*-Pflanzen zum Auflaufen bringt oder zumindest deutlich weniger als suszeptible Varietäten. Dadurch wird eine Zunahme der *Striga*-Samenzahl im Boden vermieden - der Infektionsdruck wird nicht erhöht. Der Ertrag ist gegenüber nicht-infizierten Feldern gleich oder bei *Striga*-Befall zumindest deutlich geringer reduziert als bei suszeptiblen Varietäten.

Spricht man von Resistenz oder Toleranz, so müssen sowohl Wirt als auch Parasit betrachtet werden. Beim Wirt, Falschen-Wirt oder Nicht-Wirt können verschiedene Resistenzfaktoren vorliegen. Diese können auch additiver Natur sein. Der Parasit, obwohl von der gleichen Art, kann unterschiedlich virulent sein: So diskutiert man bei *Striga* die Existenz von verschiedenen „Stämmen“ oder „Biotypen“, also Unterscheidungen unterhalb des Artbegriffs (EJETA *et al.* 1991). Die Entwicklung resistenter Varietäten ist in der Pflanzenzüchtung vorrangiges Ziel, bringen solche Pflanzen ihren Schutz doch selbst mit. Der kostspielige und umweltgefährdende Einsatz von Chemikalien oder das Risiko aus der Freisetzung anderer Organismen entfallen. Tolerante Pflanzen können nur ein Zwischenschritt sein, denn sie verhindern nicht die Entwicklung von *Striga* und die Anhäufung von Samen im Boden. Dadurch steigt der Infektionsdruck, Resistenzmechanismen können so u. U. leichter durchbrochen werden. Der Parasit *Striga* kann sich weiterentwickeln, anpassen und eventuell neue Pflanzenarten befallen. Ein wichtiger Punkt bei der Entwicklung resistenter Pflanzen ist die Kenntnis über mögliche Resistenzmechanismen.

#### 1.3.3.6.1 Low stimulant

*Low stimulant* (engl.), übersetzt „wenig stimulierend“ – unter diesem Begriff versteht man einen Resistenzmechanismus, bei dem Wirtspflanzen weniger Keimungsstimulans abgeben als suszeptible Varietäten. Dies verringert die Zahl gekeimter Parasitensamen und mindert so den Befall der Wirtspflanzen. Als einer der ersten beschrieb KUMAR (1940) diese Form der Resistenz bei der Sorghum-Varietät Bilichigan gegen *Striga asiatica*. Sorghum-Varietäten,

die die Existenz eines solchen Resistenzmechanismus vermuten lassen, sind u. a. SRN 39, 555, Framida und IS-9830 (HESS *et al.* 1992). Es gibt aber eine ganze Reihe resistenter Varietäten, die nicht vom *Low stimulant*-Typ sind. Sie induzieren die Keimung von *Striga*, werden aber selbst nicht befallen. Soweit man bis jetzt weiß, wird das Merkmal *low stimulant* rezessiv vererbt und steht unter der Kontrolle von zwei oder mehr Genen.

#### 1.3.3.6.2 *Low haustorial*

Verschiedentlich wird als möglicher Resistenzmechanismus *low haustorial* diskutiert (EJETA *et al.* 1993, REDA *et al.* 1994). Der englische Begriff beschreibt analog *low stimulant* die verringerte oder Nichtabgabe eines Haustorialinduktors. Ein solcher Mechanismus würde zum Absterben der Keimlinge führen, da keine Haustorien ausgebildet werden könnten. FRICK *et al.* (1996) konnten zeigen, daß das als möglicher Hauptinduktor beschriebene 2,6-DMBQ aus Syringasäure unter milder Oxidation mittels Peroxidase hergestellt werden kann. Syringasäure ist ein ubiquitär vorkommender Metabolit u. a. der Ligninbiosynthese, und Peroxidasen sind in fast allen pathogenen Prozessen involviert. Peroxidase-Aktivität konnte auch in Keimwurzelexsudaten von *S. hermonthica* nachgewiesen werden (siehe Kap. 1.3.2.5). Aus diesen Gründen entsteht 2,6-DMBQ wohl bei der Interaktion des Parasiten *Striga* mit den Wurzeln verschiedenster Pflanzen und ist somit ubiquitär vorhanden. Somit ist *low haustorial* kein zu erwartender Resistenzmechanismus (HELLER und WEGMANN 2000).

#### 1.3.3.6.3 Inkompatibilität bei der Haustorialentwicklung

Für *S. asiatica* wird ein Resistenzmechanismus bei den Nicht-Wirten Salat (*Lactuca sativa*), Studentenblume (*Tagetes erecta*) und resistenter Kuhbohne beschrieben, der nach dem *Attachment* während der Penetration des Endophyten auftritt. Die endophytischen Zellen degenerieren, bevor der Endophyt die Endodermis erreicht hat. HOOD *et al.* (1998) vermuteten die Akkumulation phytotoxischer Substanzen. Unterstützt wird die These durch die Beobachtung nekrotischer Rindenparenchymzellen im Bereich der Wirt-Parasit-Schnittstelle.

#### 1.3.3.6.4 Hemmung der Parasiten-Exoenzyme durch Wirtswurzelexsudate

Die Keimwurzel der Wurzelparasiten scheidet Exoenzyme aus, um in das Gewebe der Wirtswurzel eindringen zu können. Durch den Abbau bzw. die Desintegration von Stoffen wie Pektin, Hemicellulose und Cellulose ist das Vordringen bis zum Zentralzylinder der

Wirtswurzel möglich. Dort kann dann der Anschluß an das Wirtsgefäßsystem erfolgen. Stoffe, die der Wirt ausscheidet und die zur Reduktion der Exoenzymaktivität führen, sind ein möglicher Resistenzmechanismus (HELLER und WEGMANN 2000).

#### 1.3.3.6.5 Mechanische Resistenz

Die Lignifizierung von Zellwänden spielt als Schutz vor der Penetration durch eine Keimwurzel wohl nur eine geringere Rolle als anfangs gedacht, da das Wachstum des Haustoriums zuerst entlang der Mittellamelle erfolgt (JOEL und LOSNER-GOSHEN 1994). Unterstützt wird diese Annahme durch den Nachweis pektolytischer Enzymaktivität in den Keimwurzelexsudaten von *S. hermonthica*. Erst beim Erreichen des Zentralzylinders müssen Zellwände überwunden werden. Einige Pflanzen, die weniger von *Striga* befallen wurden, zeigten verstärkte Cellulosewände (OLIVIER *et al.* 1991). Eine Sorghum-Varietät, für die mechanische Resistenzfaktoren postuliert werden, ist N-13.

#### 1.3.3.6.6 Vermeidung

Eine Wurzelstruktur der Wirtspflanzen, bei der wenige Wurzeln senkrecht nach unten wachsen und erst in tieferen Bodenschichten eine horizontale Ausbreitung stattfindet, verringert das Infektionsrisiko, da vorwiegend nur in den oberen Bodenschichten die Parasitensamen keimfähig sind. In tieferen Bodenschichten reicht der Sauerstoff für die Keimung nicht aus (CHERIF ARI *et al.* 1990). Als alleiniger Resistenzfaktor genügt dies wohl nicht, einen Befall zu verhindern. Ein solcher Wurzelaufbau kann aber einen zusätzlichen Beitrag zur Resistenz leisten. Ein Beispiel hierfür ist die Sorghum-Varietät P-967083. Möglicherweise spielt dieser Resistenzfaktor auch bei *Framida* eine Rolle.

#### 1.3.3.6.7 Antibiosis – Phytohormonversorgung

Der Parasit ist auf stoffliche Wechselwirkungen mit dem Wirt angewiesen. So könnte eine ungünstige Phytohormonversorgung über die Wurzel der Wirtspflanze die weitere Entwicklung des Parasiten stark einschränken. Beobachtet wurde dies bei Lein (*Linum usitatissimum*) und Sorghum-Varietäten (WEGMANN 1996). Da die Produktion von Phytohormonen in sehr komplexe Regelkreise eingebunden ist, sind züchterische Eingriffe hier äußerst schwierig.

### 1.3.3.6.8 Phytoalexine

Das Wort *Phytoalexin* ist griechischen Ursprungs und setzt sich aus *phyton* = „Pflanze“ und *alexein* = „sich verteidigen“ zusammen. Erste Berichte über eine pflanzliche Abwehr findet man zu Beginn des 20. Jahrhunderts (WARD 1905, BERNARD 1909, STAKMAN 1915). MÜLLER und BÖRGER formulierten 1940 die These von einem Resistenzmechanismus in Pflanzen, bei dem eine Abwehrsubstanz, ein Phytoalexin, die Hauptrolle spielt (MÜLLER und BÖRGER 1940). Eine Definition des Phytoalexin-Begriffs aus dem Jahr 1980 lautet: „Phytoalexine sind niedermolekulare, antimikrobiell wirkende Stoffe, die von einer Pflanze beim Kontakt mit Mikroorganismen oder Viren gebildet und akkumuliert werden“ (DEVERALL 1982). Diese sehr enge Definition von Phytoalexinen erfuhr bald darauf eine Erweiterung (BAILEY 1982). Danach kommen als Auslöser der Phytoalexin-Synthese nicht nur Mikroorganismen oder Viren in Betracht, sondern Streßfaktoren allgemein. Und die Wirkung von Phytoalexinen ist nicht nur auf Mikroorganismen beschränkt (HEMLEBEN 1990, KÚC 1995). Phytoalexine sind Stoffe des Sekundärmetabolismus, die nicht konstitutiv gebildet werden, sondern deren Produktion induziert werden muß. Auslöser der Synthese sind verschiedene Reize, Streßfaktoren und bestimmte Stoffe, sogenannte Elicitoren (Tab. 1-1).

Tab. 1-1: Elicitoren und Streßfaktoren – Beispiele.

| Elicitoren (biotisch)                                                         | Streßfaktoren (abiotisch)   |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| — Stoffe von Pilzen und Bakterien<br>(z. B. Zellwandbestandteile und Pektine) | — UV-Licht                  |
| — Viren und Tiere, z. B. Nematoden<br>(ihre Bausteine, Stoffwechselprodukte)  | — Temperatur (Hitze, Kälte) |
| — Pflanzenteile, z. B. Zellwandbestandteile<br>nach Verwundung                | — Schwermetallionen         |
| — Peptide, Enzyme                                                             | — Detergentien              |
| — Polysaccharide                                                              |                             |
| — Fettsäuren                                                                  |                             |

Phytoalexine sind pflanzenspezifisch. Erfolgt ihre Produktion schnell genug und führt diese zu einer (ausreichend) hohen lokalen Konzentration, sind Phytoalexine (meist) toxisch für Pilze, Bakterien und andere Parasiten. Sichtbares Zeichen der Abwehr ist die Ausbildung von nekrotischen Flecken im Pflanzengewebe. Die These, daß Phytoalexine auch beim Befall durch Phytoparasiten wie *Orobanche* gebildet werden könnten, wurde erstmals von

WEGMANN (1986) geäußert. Nachgewiesen wurde dies für die resistente Sonnenblumen-Varietät *Helianthus annuus* cv. 81-14, die Scopoletin gegen *O. cumana*, und für die Kichererbsen-Varietät *Cicer arietinum* ILC 280, die Medicarpin und Maackiain gegen *O. crenata* bildet (WEGMANN *et al.* 1991). Als Phytoalexine bei Sorghum sind Apigeninidin und Luteolinidin bekannt, allerdings konnten sie nur in Blättern gefunden werden (NICHOLSON *et al.* 1987, HIPSKIND *et al.* 1990) (Abb. 1-5). Für die Resistenz gegenüber dem Wurzelparasiten *Striga* wären allerdings Phytoalexine im Wurzelbereich entscheidend.

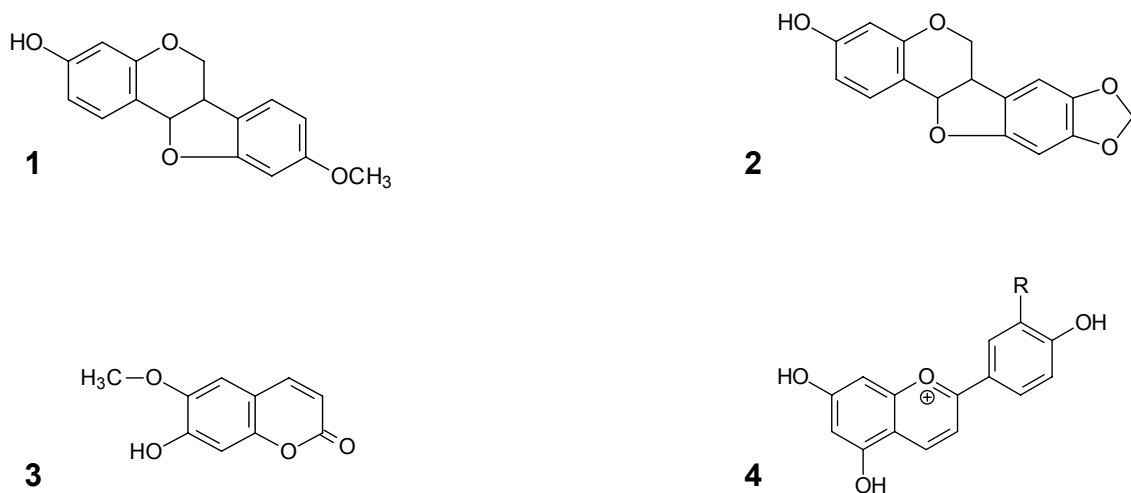


Abb. 1-5: Molekülstrukturen der Phytoalexine verschiedener Pflanzen – aus Kichererbse (*Cicer arietinum*) **1**) Medicarpin und **2**) Maackiain, aus Sonnenblume (*Helianthus annuus*) **3**) Scopoletin und aus Sorghum (*Sorghum bicolor*) **4**) Apigeninidin (R=H) und Luteolinidin (R=OH).

#### 1.3.3.6.9 Insensitivität gegenüber *Striga*-Toxin

Falls ein „*Striga*-Toxin“ existiert, wäre die Insensitivität der Wirtspflanze ihm gegenüber ein wichtiger Resistenzfaktor. Für die Sorghum-Varietät SRN 39 werden solche Mechanismen diskutiert (EJETA *et al.* 1993).

## 1.4 Genetische Grundlagen des Wirt-Parasit-Systems

### 1.4.1 Genetik der Wirtspflanzenresistenz

Genetische Untersuchungen der Wirtspflanzenresistenz sind schwierig, da es wenige resistente Varietäten gibt und der genaue Resistenzmechanismus meist noch nicht aufgeklärt

ist. Auch mangelt es an geeigneten Techniken für die Evaluation der Resistenz. Feldversuche werden durch Umwelteinflüsse stark beeinflusst, was ihre Aussagekraft relativiert. Schon 1933 wurden Versuche unternommen, gegen *S. asiatica* resistente Sorghum-Varietäten durch Kreuzung zu züchten und Aussagen über die Vererbung zu treffen (SAUNDERS 1933). Das Bild der genetischen Grundlagen ist aber bis heute diffus: Autoren fanden rezessive, dominante und codominante Resistenzmerkmale, die von einem oder mehreren Genen kontrolliert werden und von additiver oder nicht-additiver Natur sind. Für die Varietäten Framida, 555 und SRN 4846 beschrieben RAMAIAH *et al.* (1990), daß das Merkmal *low stimulant* durch ein rezessives Gen vererbt wird. Auch in SRN 39 soll bei der Vererbung der Resistenz ein einzelnes, kernkodierte, rezessives Gen mit additiver Genwirkung eine bedeutende Rolle spielen (VOGLER *et al.* 1996).

#### **1.4.2 Variabilität und Wirtsspezifität des Parasiten *Striga hermonthica***

Nur wenige Arbeiten beschäftigten sich mit der genetischen Variation von *Striga hermonthica* auf molekularer Ebene. Hauptsächlich handelte es sich um Experimente mit Cokulturen von *Striga* und verschiedenen Wirtspflanzen. Untersucht wurde die (genetische) Variabilität von *S. hermonthica*, die in der unterschiedlichen Virulenz a) gegenüber verschiedenen Wirtsarten (engl. *intercrop variability*) und b) gegenüber verschiedenen Varietäten einer Wirtsart (engl. *intracrop variability*) zum Ausdruck kommt. Zur Quantifizierung der Virulenz wurden meist die Zahl an (oberirdischen) *Striga*-Pflanzen und die Chlorose-Schäden an den Blättern der Wirtspflanzen herangezogen. Bereits 1933 demonstrierte Saunders die Existenz von Resistenzmerkmalen in Sorghum gegen *S. asiatica* (SAUNDERS 1933). DOGETT (1965) berichtete von der Sorghum-Varietät Dobbs aus Ostafrika, die eine gewisse Resistenz gegenüber *S. hermonthica* besaß, die nicht auf *low stimulant* beruhte. Der Umstand, daß bei Versuchen in verschiedenen geographischen Gebieten die gleichen Varietäten ein unterschiedliches Maß an Resistenz gegenüber *Striga* aufwiesen, führte zu kontroversen Diskussionen. PARKER und REID (1979) postulierten, daß der Grund für das unterschiedliche Resistenzverhalten in verschiedenen physiologischen Varianten der *Striga*-Arten liegen könnte. LEWIN (1932) stellte als erster die These von wirtsspezifischen *Striga*-Stämmen auf. Experimente mit Sorghum und Pearl-Millet stützten die These von der Existenz von *S. hermonthica*-Stämmen oder Typen, die spezifisch für bestimmte Wirtspflanzenarten sind (WILSON-JONES 1955, PARKER und REID 1979, KIM *et al.* 1994). Zur Beschreibung von Stämmen mit einer Spezifität gegenüber bestimmten Wirtspflanzenarten benutzt man den englischen Ausdruck *intercrop-specific strains* (RAMAIAH und PARKER 1982). Bestimmte

*S. hermonthica*-Typen können durchaus aber auch mehrere verschiedene Wirte befallen. So wuchsen in Indien bestimmte *S. hermonthica*-Typen sowohl auf Sorghum als auch auf Zuckerrohr, andere sowohl auf Sorghum als auch auf Mais und weitere sowohl auf Sorghum als auch auf Pearl-Millet (VASUDEVA RAO und MUSSELMAN 1987). *S. hermonthica* zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, durch Adaption neue Wirte befallen zu können. In den verschiedenen Populationen tauchen immer wieder einzelne Individuen mit neuen Spezifitäten auf, die dann neue Subpopulationen aufbauen können (PARKER und RICHES 1993). Die Coevolution von Parasit und Wirt bietet aber auch Wirtspflanzen einen Vorteil: So haben afrikanische Sorghum-Landrassen eine gewisse Toleranz gegenüber *S. hermonthica* entwickelt, deren Mechanismen man sich in Züchtungsprogrammen zunutze machen will. Im Gegensatz zu den *intercrop-specific strains* gibt es auch die Spezifität von *Striga* gegenüber verschiedenen Varietäten einer Wirtsart. Man spricht dann von (engl.) *crop cultivar-specific strains* oder *intracrop-specific strains* (BEBAWI 1981, RAMAIAH und PARKER 1982). Mögliche Ursachen für die Wirtsspezifität von *Striga* liegen in den Anforderungen des Parasiten an den Wirt bezüglich Keimung, Haustorialentwicklung, *Attachment* und Penetration sowie in der Versorgung mit Nährstoffen und Wasser. Auch das Vorhandensein bestimmter Phytohormone und weiterer Stoffe kann die Spezifität von *Striga*-Arten oder *Striga*- (Bio-) Typen für bestimmte Wirtspflanzen erklären (RAMAIAH 1987).

#### 1.4.3 Genetik von *Striga hermonthica*

Noch weniger als über die Genetik der Wirtspflanzenresistenz ist über die Genetik der Gattung *Striga* bekannt. Die Wirtspflanzenresistenz liegt noch im Blickfeld der Pflanzenzüchter, deren Ziel es ist, möglichst schnell *Striga*-resistente Genotypen herzustellen. Dagegen sind die Genetik von *Striga* und die genetische Interaktion von Parasit und Wirt zu komplex und die Beschäftigung damit zu langwierig für die Belange der Züchter. Nichtsdestotrotz sind Kenntnisse der genetischen Grundlagen und der genetischen Variabilität von *Striga* längerfristig gesehen von entscheidender Bedeutung. Nur unter Anwendung dieses Wissens kann in Zukunft die Entwicklung resistenter Genotypen unter Nutzung aller möglichen Mechanismen der Wirtspflanzenresistenz gelingen. Untersuchungen der genetischen Diversität bei wirtsspezifischen Populationen von *S. hermonthica* wurden von BHARATHALAKSHMI *et al.* (1990) mittels Isoenzymanalyse durchgeführt. Die Daten von neun Genorten kodierend für acht Enzyme (Glucose-6-phosphat Dehydrogenase, G 6 PDH, EC 1.1.1.49; Aspartataminotransferase, engl. *glutamic-oxaloacetic transaminase*, GOT, EC 2.6.1.1; Isocitrat-Dehydrogenase, IDH, EC 1.1.1.42; Malat-Dehydrogenase, MDH,



EC 1.1.1.37; Phosphoglucomutase, PGM, EC 2.7.5.1; 6-phosphogluconat-Dehydrogenase, 6 PGDH, EC 1.1.1.44; Shikimat-Dehydrogenase, SKDH, EC 1.1.1.25 und Leucinamino-peptidase, LAP, EC 3.4.1.1) wurden von drei *S. hermonthica*-Populationen ermittelt: einer auf Sorghum wachsenden aus dem Sudan und zwei aus Burkina Faso, eine auf Sorghum, die andere auf Millet wachsend. Die Untersuchungen zeigten, daß die beiden auf unterschiedlichen Wirten wachsenden Populationen aus Burkina Faso näher miteinander verwandt waren, verglichen mit den beiden auf Sorghum wachsenden Populationen aus dem Sudan und Burkina Faso. Hieraus ließe sich schlußfolgern, daß die genetische Diversität von *S. hermonthica*-Populationen mehr von der geographischen Distanz als von der Wirtsspezifität bestimmt würde. Folgende Entwicklungsvorgänge wären denkbar: Zuerst hatte eine umfassende Anpassung an die geographischen Gegebenheiten stattgefunden, und erst im zweiten Schritt erfolgte eine Wirtsspezialisierung, die weniger Anpassung erforderte. Eine weitere Isoenzymanalyse wurde von OLIVIER *et al.* (1998) durchgeführt. Sie untersuchten Enzyme, die aus den Samen einzelner Pflanzen von vierzehn *S. hermonthica*-Populationen isoliert worden waren. Die *S. hermonthica*-Pflanzen waren auf Sorghum, Millet, Mais und Wildgräsern in Burkina Faso, Mali und Niger gewachsen. Zwei Enzyme wurden analysiert: Alkoholdehydrogenase (ADH, EC 1.1.1.1) und GOT. Es zeigte sich eine nur geringe genetische Divergenz zwischen den verschiedenen Populationen. Geht man davon aus, daß hauptsächlich die geographische Distanz und nicht die Wirtsspezifität zur genetischen Divergenz beiträgt (s. o.), dann läßt sich das Ergebnis leicht erklären: Die drei Länder Burkina Faso, Mali und Niger liegen alle eng benachbart im Westen Afrikas – die geographische Distanz ist also gering. KUIPER *et al.* (1996a) untersuchten u. a. sechs Populationen aus Westafrika und neun aus Kenia mittels acht Isoenzymmarkern: Esterase, EST, EC 3.1.1.-; Glutamat-Dehydrogenase, GDH, EC 1.4.1.2; Menadion-Reduktase, MDR, EC 1.6.99.2; Malat-Enzym, ME, EC 1.1.1.39; Phosphoglucoisomerase, PGI, EC 5.3.1.9 sowie PGM, SKDH und LAP. Sie fanden in Übereinstimmung mit der o. g. These eine genetische Divergenz aufgrund der Herkunft (zwischen Westafrika und Kenia/Ostafrika), nicht aber aufgrund der Wirtsspezifität.

## 1.5 Ziele der Arbeit

Für die Entwicklung neuer resistenter Nutzpflanzen ist ein umfassendes Verständnis der Wirt-Parasit-Beziehungen von entscheidender Bedeutung.

### 1.5.1 Wirt-Parasit-Interaktion von *Sorghum* und Pearl-Millet mit *Striga hermonthica*

Bei der Interaktion der Wirte *Sorghum* (*Sorghum bicolor*) und Pearl-Millet (*Pennisetum glaucum*) mit dem Parasiten *Striga hermonthica* spielen verschiedenste Faktoren eine Rolle. In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Faktoren daraufhin überprüft, ob sie bei den untersuchten Sorghum- und Millet-Varietäten als mögliche Resistenzfaktoren zum Tragen kommen:

- Keimungsstimulantien:

Im Rahmen der Arbeit sollte die Art und die Zusammensetzung (Bouquet) der Keimungsstimulantien verschiedener Wirte und Wirtsvarietäten aufgeklärt werden. Verschiedene Bouquets wären eine Möglichkeit, das unterschiedliche Vermögen zur Induktion der *Striga*-Keimung zu erklären.

- Haustorium:

Die Mechanismen der Haustorialentwicklung sollten untersucht werden, insbesondere der Bedarf und die Art der nötigen Wirtsfaktoren.

- Wirkung von Wirtswurzelexsudaten auf Parasiten-Exoenzyme:

*S. hermonthica*-Keimwurzeln scheiden Exoenzyme aus. Es sollte deshalb untersucht werden, ob Stoffe aus den Wurzeln der (potentiellen) Wirtspflanzen die Exoenzym-Aktivität und damit die Penetrationsfähigkeit beeinflussen.

- Phytoalexine:

In Untersuchungen von Wirtswurzeln und Wurzelexsudaten sollte geklärt werden, ob Sorghum-Wurzeln Phytoalexine bilden, die einen *Striga*-Angriff abwehren könnten.

- Lignifizierung der Sorghum-Wurzeln:

An Sorghum-Wurzelproben sollte überprüft werden, ob es bei verschiedenen Varietäten zur verstärkten Einlagerung von Lignin in die Wurzeln kommt. Solchermaßen „verstärkte“ Wurzeln könnten eine *Striga*-Attacke abwehren oder zumindest mindern.

### **1.5.2 Morphologische Charakterisierung und genetische Variabilität von *Striga hermonthica***

Im Rahmen des *Restricted Core Project* „*Striga* Resistance in Sorghum“ von ICRISAT (*International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics*<sup>4</sup>), den Universitäten Hohenheim und Tübingen wurden verschiedene *Sorghum bicolor*-Varietäten gezüchtet. Ziel war es, Sorghum-Pflanzen zu erhalten, die resistent gegen *Striga hermonthica* sind. Dazu wurden in den westafrikanischen Ländern Mali und Niger sowie im ostafrikanischen Kenia Feldversuche durchgeführt. Es zeigte sich, daß Varietäten, die in Mali wenig *S. hermonthica*-Befall aufwiesen, im Gegensatz dazu in Kenia sehr stark befallen waren<sup>5</sup>. Mögliche Ursachen hierfür waren entweder die unterschiedlichen Umweltbedingungen (meteorologische Faktoren), agroökologische Faktoren wie Bodentypen und Bodenmikroflora oder aber auch das Auftreten verschiedener Parasiten. So wäre es möglich, daß in den verschiedenen Ländern bzw. Regionen unterschiedliche Typen oder Formen von *S. hermonthica* vorherrschen (siehe Kap. 1.4.2). Möglicherweise handelt es sich auch um eine andere, mit *S. hermonthica* eng verwandte (Unter-) Art der Gattung *Striga*.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Verfahren auf ihre Eignung untersucht zu klären, ob in verschiedenen Regionen unterschiedliche Typen von *S. hermonthica* existieren oder andere mit *S. hermonthica* verwandte (Unter-) Arten auftreten. Zum einen wurden morphologische Merkmale von Samen und Blüten sowie genetische Informationen herangezogen. Zum anderen wurden auf der Ebene der Erbsubstanz, der DNA (engl. für Desoxyribonukleinsäure, DNS) die genetische Variabilität von neunzehn *S. hermonthica*-Populationen mehrerer Orte aus sieben afrikanischen Ländern und einem Land der arabischen Halbinsel untersucht (Abb. 1-6). Dabei wurde sowohl die Variabilität in den Populationen als auch zwischen den verschiedenen Populationen betrachtet. Die Samen, die zur Anzucht der Pflanzen verwendet wurden, unterschieden sich neben ihrer geographischen Herkunft auch in dem

- a) Erntejahr und
- b) Wirt (u. a. Sorghum und Millet) auf dem die samenproduzierenden *S. hermonthica*-Pflanzen gewachsen waren.

---

<sup>4</sup> ICRISAT – International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, Patancheru 502324, Andhra Pradesh, Indien.

<sup>5</sup> K. Wegmann, Institut für Pflanzenbiochemie, Universität Tübingen, persönliche Mitteilung.

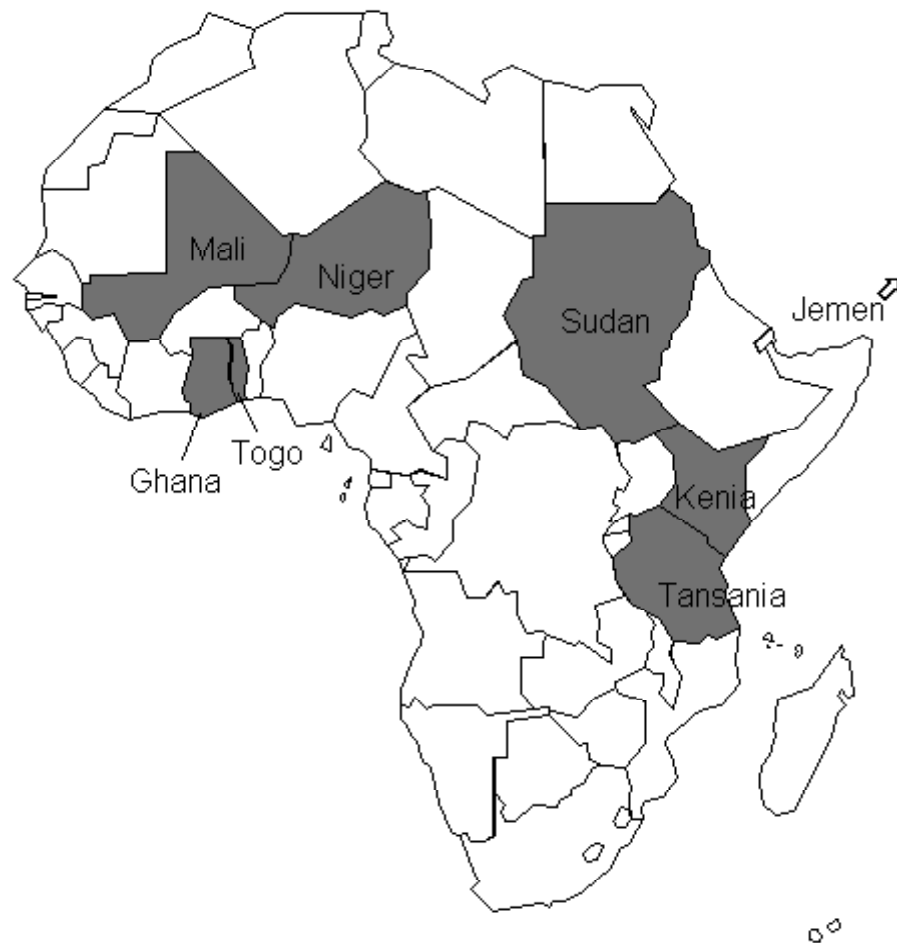


Abb. 1-6: Herkunft der in den Untersuchungen verwendeten Samen von *Striga hermonthica* – Herkunftsländer auf dem afrikanischen Kontinent sind grau unterlegt, dazu Jemen.

In der Literatur konnten keine Informationen über genetische Untersuchungen bei *Striga* gefunden werden, die auf der DNA-Analyse basierten. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Verfahren der Genomanalyse überprüft, ob sie sich zur Untersuchung des Parasiten *Striga hermonthica* eignen: die RFLP-Analyse und die RAPD-PCR.

#### 1.5.2.1 RFLP-Analyse

In der RFLP (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus)-Analyse wird das Vorhandensein und die unterschiedliche Lage von Schnittstellen für Restriktionsenzyme auf den Chromosomen ausgenutzt. Durch die evolutionäre Entwicklung können verschiedene Genotypen unterschiedlich verteilte Schnittstellen besitzen. Setzt man bestimmte Restriktionsenzyme zum Verdau ein, so erhält man DNA-Fragmente charakteristischer Länge. Diese lassen sich anschließend in einer Gelelektrophorese auftrennen. Hybridisiert man

anschließend mit geeigneten Sonden, so können definierte Bandenmuster erhalten werden. Oft ist dann eine Unterscheidung von Genotypen aufgrund des unterschiedlichen Bandenmusters (Polymorphismen) möglich. Häufig werden Oligonukleotidsonden mit sich wiederholenden Sequenzmotiven wie (GATA)<sub>n</sub>, (GACA)<sub>n</sub> und (GTG)<sub>n</sub> eingesetzt. Diese Sonden hybridisieren mit repetitiven DNA-Bereichen des Genoms, welche als SSR (engl. *Simple Sequence Repeats*, einfache Sequenzwiederholungen) oder auch als Mikrosatelliten bezeichnet werden. SSRs sind bei Eukaryonten über das gesamte Genom verstreut und zeigen einen hohen Grad an Polymorphismen. Als eine der ersten agronomisch wichtigen Pflanzen wurde Mais mittels RFLP-Analyse untersucht (HELENTJARIS *et al.* 1985). In der Folge wurden Oligonukleotidsonden bei den verschiedensten höheren Pflanzen zur Erstellung eines sogenannten „genetischen Fingerabdrucks“ erfolgreich eingesetzt (WEISING *et al.* 1989a, WEISING *et al.* 1989b, WEISING *et al.* 1991). Neben Oligonukleotidsonden lassen sich auch Sonden mit Fragmenten ribosomaler Gene zur Identifizierung von Genotypen verwenden (GRUBER 1991, BORISJUK *et al.* 1994). Kernkodierte 18S rDNA-Sequenzen wurden schon zur phylogenetischen Untersuchung parasitischer Pflanzen der *Scrophulariaceae* und *Orobanchaceae* herangezogen. Normalerweise sind diese Sonden nicht geeignet, um Analysen unterhalb der Familienebene ausführen zu können. Doch bei den *Orobanchaceae* ermöglichte die hohe Variabilität durch Nukleotidaustausche es dennoch, Arten zu unterscheiden (NICKRENT und DUFF 1996).

#### 1.5.2.2 RAPD-PCR

Die RAPD (engl. *Random Amplified Polymorphic DNA*)-PCR-Methode (WELSH und MCCLELLAND 1990, WILLIAMS *et al.* 1990, WILLIAMS *et al.* 1993) ist verglichen mit der RFLP geschichtlich etwas jünger und basiert auf der PCR (engl. *Polymerase Chain Reaction*, Polymerasekettenreaktion) (SAIKI *et al.* 1985, MULLIS *et al.* 1986). Die kontinuierliche PCR, so wie sie heute routinemäßig eingesetzt wird, ist erst durch den Einsatz einer thermostabilen DNA-Polymerase, z. B. der aus *Thermus aquaticus*, möglich geworden (SAIKI *et al.* 1988). Polymorphismen in kodierenden und nicht-kodierenden DNA-Abschnitten können detektiert werden. Zuerst wird die zu untersuchende DNA denaturiert, d. h. die Doppelstränge werden in Einzelstränge aufgeschmolzen. Kurze, meist zehn Basenpaare lange DNA-Stücke mit definierten, aber zufällig gewählten Sequenzen (*Primer*) dienen dann als Startpunkte. Sie hybridisieren an komplementären Sequenzen mit der denaturierten DNA (*Annealing*) und werden durch die thermostabile DNA-Polymerase verlängert. Danach werden die

entstandenen Doppelstränge wieder denaturiert, neue *Primer* hybridisieren mit der Ausgangs-DNA und, eine komplementäre Sequenz vorausgesetzt, an der neu synthetisierten DNA. An den Enden der *Primer* kommt es dann erneut zur Strangverlängerung. Der Ablauf von Denaturierung, *Annealing* und Verlängerung wird anschließend vielfach wiederholt. Bei geeigneten Reaktionsbedingungen (Zusammensetzung des PCR-Ansatzes, Temperatur und Dauer der verschiedenen Prozeßschritte) kommt es zur Vervielfältigung (Amplifizierung) des dazwischen liegenden Genabschnitts. Da die *Annealing*-Positionen von der Sequenz der DNA abhängig sind, können verschiedene Genotypen unterschiedliche *Annealing*-Positionen besitzen. Die Folge ist, daß unterschiedliche DNA-Abschnitte vervielfältigt werden, deren Größe von wenigen hundert bis zu einigen tausend Basenpaaren betragen kann (INNIS *et al.* 1990). Diese DNA-Fragmente lassen sich anschließend mittels Gelelektrophorese auftrennen, und man erhält so (häufig) ein charakteristisches Bandenmuster. Bei Phytoparasiten der Gattung *Orobanche* wurden erste Untersuchungen mittels RAPD-PCR-Techniken durchgeführt (KATZIR *et al.* 1996, PARAN *et al.* 1997, ZEID *et al.* 1997).

#### 1.5.2.3 Phylogenetische Untersuchungen

Geninformationen, die man z. B. aus RAPD-PCR-Untersuchungen erhält, können zur Untersuchung der Verwandtschaftsverhältnisse von Organismen verwendet werden. Aus den DNA-Daten lassen sich mit verschiedenen mathematischen Verfahren Verwandtschaftsverhältnisse errechnen (BAXEVANIS und OUELLETTE 1998). Die Darstellung erfolgt meist in der übersichtlichen Form eines Stammbaums. Ein Verfahrenstyp basiert auf der Ermittlung der Unähnlichkeit – der Distanz zwischen Sequenzen. Zu den Distanz-basierten Methoden gehört das Verfahren nach *UPGMA* (engl. *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*). *UPGMA* verbindet Zweige eines Stammbaums nach dem Kriterium der größten Ähnlichkeit zwischen Paaren und den Durchschnitten verbundener Paare. Andere Verfahren basieren auf der Merkmalsverteilung (engl. *character-based*). Merkmals-basierte Verfahren versuchen Bäume zu generieren, die die Verteilung des Datenmusters für jedes Merkmal optimieren. Das merkmals-basierte Verfahren nach *Maximum Parsimony* (MP, engl., maximale Sparsamkeit) versucht die Daten auf dem „einfachsten Weg“ herzuleiten, mit der geringsten Zahl an Annahmen und Randbedingungen. Stammbäume werden so optimiert, daß von der (hypothetischen) Ausgangsposition bis zum Ist-Zustand die geringste Zahl an Veränderungsschritten nötig ist – also die Veränderung mit „maximaler Sparsamkeit“ erreicht wird.

### **1.5.3 *In vitro*-Kultur von *Striga hermonthica***

Die Etablierung von *In vitro*-Kulturen von *Striga hermonthica* bietet die Voraussetzung für eine große Zahl an Experimenten, bei denen es von Vorteil ist, definierte, unter sterilen Bedingungen wachsende *S. hermonthica*-Pflanzen (Klone) oder Gewebe- und Zellkulturen einsetzen zu können. So können *Striga*-Zellkultur-Testsysteme zum Beispiel dazu verwendet werden, Herbizide, Phytotoxine, Phytoalexine oder Induktoren von Keimung und Haustorialentwicklung zu testen. Eigenschaften, die bei Nachkommen einer Mutterpflanze durchaus unterschiedlich sein können. Oder aber sie ermöglichen die Durchführung metabolischer Studien ohne Wirtspflanzen. *Striga*-Klone können bei der Evaluation der Resistenz von „Wirtspflanzen“ und bei Studien zu Wechselwirkungen zwischen Wirt und Parasit hilfreich sein. Auch läßt sich mit solchen Klonen Parasiten-DNA für genetische Untersuchungen und Transformationsexperimente gewinnen, ohne Parasiten z. B. im Gewächshaus anziehen zu müssen. OKONKWO (1964 und 1966a) gelang es als erstem, *S. hermonthica* unter sterilen Bedingungen und ohne Kontakt zu einer Wirtspflanze anzuziehen, wenn auch unter Verwendung von Exsudaten von Wirtspflanzen. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht ein System zu entwickeln, das es ermöglicht, *S. hermonthica*-Pflanzen aus unterschiedlichen Populationen unter völligem Verzicht auf Stoffe von (Wirts-) Pflanzen *in vitro* zu kultivieren.





## 2 MATERIAL

### 2.1 Organismen

#### 2.1.1 Saatgut

#### Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)

Zuchtlinien und lokale Varietäten, kühl gelagert bei T = 4 °C im Kühlraum

Tab. 2-1: Saatgut verschiedener Varietäten von Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) – Herkunft und Eigenschaften.

|                                   | Varietät           | Beschreibung                                              | Resistenz ↔ <i>Striga</i> |
|-----------------------------------|--------------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------|
| ICRISAT<br>Züchtungs-<br>programm | N-13 (IS-18475)    | mechanische Resistenz-<br>mechanismen gegen <i>Striga</i> | resistent                 |
|                                   | 555                | <i>low stimulant</i>                                      | resistent                 |
|                                   | Framida (IS-3167)  | weite Toleranz                                            | resistent                 |
|                                   | IS-9830            | verbesserte lokale Varietät<br>aus Sudan                  | resistent                 |
|                                   | Seredo             | verbesserte lokale Varietät<br>aus Uganda                 | resistent                 |
|                                   | E-36-1 (IS-30469)  | „ <i>stay green</i> “                                     | suszeptibel               |
|                                   | M-35-1 (IS-1054)   | Trockentoleranz –<br>erwachsene Pflanze                   | suszeptibel               |
|                                   | DS-1195 (IS-21968) | Trockentoleranz – Sämling                                 | suszeptibel               |
|                                   | IS-1037            | Trockentoleranz – Sämling<br>& erwachsene Pflanze         | suszeptibel               |
| Lokale<br>Varietäten              | CSM-209            | lokale Varietät aus<br>Samanko (Mali)                     | suszeptibel               |
|                                   | CSM-335            | lokale Varietät aus<br>Samanko (Mali)                     | suszeptibel               |
|                                   | Toroniou C1        | —                                                         | suszeptibel               |

Die Klassifizierung in der Tabelle als „resistent“ oder „suszeptibel“ erfolgt aufgrund der Ergebnisse in Feldversuchen (ICRISAT, Samanko, Mali). Dies bedeutet aber nicht, daß bei resistent eingestuft Varietäten weitergehende Kenntnisse über die Art der „Resistenz“ und des zugrunde liegenden Mechanismus bekannt sind.

## Millet

Pearl-Millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.), kühl gelagert bei T = 4 °C im Kühlraum

Tab. 2-2: Saatgut verschiedener Varietäten von Pearl-Millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) – Herkunft und Eigenschaften.

| Varietät                           | Herkunft              | Resistenz ↔ <i>Striga</i> |
|------------------------------------|-----------------------|---------------------------|
| Millet 1991/1                      | Universität Hohenheim | suszeptibel               |
| Soxsat<br>(Souna × Sanio T C – 88) | ICRISAT, Mali         | suszeptibel               |
| Boboni                             | ICRISAT, Mali         | suszeptibel               |

Die Klassifizierung in der Tabelle als „suszeptibel“ erfolgt aufgrund der Ergebnisse in Feldversuchen (ICRISAT, Samanko, Mali).

Das Sorghum- und Millet-Saatgut wurde erhalten von:

Dr. D. Hess, ICRISAT, Niamey, Niger und

Dr. B. Haußmann, ICRISAT, Samanko, Mali und Institut für Pflanzenzüchtung,  
Saatgutforschung und Populationsgenetik, Universität Hohenheim

## *Striga hermonthica* (Del.) Benth.

Tab. 2-3: Samen von *Striga hermonthica* (Del.) Benth. – verschiedene Herkünfte.  
Nähere Proben- bzw. Ortsbezeichnungen sowie die Wirtspflanzen sind angegeben, soweit bekannt

| Herkunft | Ort/Bezeichnung | Wirt          | Erntejahr | Bezeichnung |
|----------|-----------------|---------------|-----------|-------------|
| Ghana    | Naes            |               | 1986      | G/Na/86     |
| Ghana    |                 |               | 1991      | G/91        |
| Ghana    | Novel           |               | 1992      | G/No/92     |
| Ghana    |                 |               | 1993      | G/93        |
| Kenia    |                 |               | 1992      | K/92        |
| Kenia    |                 |               | 1994      | K/94        |
| Kenia    | Kisumu          | Sorghum, Mais | 1996      | K/K/96      |
| Kenia    | Kisumu          | Sorghum, Mais | 1996      | K/G/96      |
| Mali     | Samanko         |               | 1993      | M/93        |
| Mali     | Samanko         | Sorghum       | 1995      | M/95        |
| Mali     | Cinzana         | Sorghum       | 1995      | M/ZS/95     |
| Mali     | Cinzana         | Millet        | 1995      | M/ZM/95     |
| Niger    |                 |               | 1994      | N/94        |
| Sudan    |                 |               | 1988/89   | S/88        |
| Sudan    |                 |               | 1993      | S/93        |
| Tansania |                 |               | 1994      | Ta/94       |
| Togo     | Kava            |               | 1988      | To/K/88     |
| Togo     | Savanne         |               | 1988      | To/S/88     |
| Jemen    |                 |               | 1988      | Y/88        |

Die *Striga hermonthica*-Samen wurden zur Verfügung gestellt von:  
Dr. B. Haußmann, ICRISAT, Samanko, Mali und Institut für Pflanzenzüchtung,  
Saatgutforschung und Populationsgenetik, Universität Hohenheim und  
Prof. Dr. Dr. h. c. K. Wegmann, Institut für Pflanzenbiochemie, Universität Tübingen

### **2.1.2 Pflanzenmaterial**

#### **Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)**

Wurzelballen von Sorghum-Pflanzen der Varietäten N-13, 555, Framida, IS-9830, Seredo und E-36-1, gewaschen und getrocknet, wurden zur Verfügung gestellt von:  
Dr. B. Haußmann, ICRISAT, Samanko, Mali und Institut für Pflanzenzüchtung,  
Saatgutforschung und Populationsgenetik, Universität Hohenheim

#### **Süßkartoffel (*Ipomoea batatas*)**

Frische Wurzeln von Süßkartoffeln, eingesetzt in Keimungstests für *S. hermonthica*-Samen, wurden erhalten von:  
Dr. A. Gutierrez, National Agrarian University La Molina, Lima, Peru

### **2.1.3 Pilzstämme**

Die Pilzstämme wurden als Biotestorganismen in der Bioautographie zum Nachweis von Phytoalexinen eingesetzt. *Aspergillus niger*-Sporen fanden auch als mögliche Elicitoren der Phytoalexin-Synthese Verwendung.

*Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*

Dr. J. Eberspächer, Institut für Mikrobiologie, Universität Hohenheim

*Botrytis cinerea*

Prof. Dr. G. Winkelmann, Lehrstuhl für Mikrobiologie und Biotechnologie, Universität Tübingen

*Cladosporium herbarum* (F92)

Dr. E. Langer, Lehrstuhl für spezielle Botanik und Mykologie, Universität Tübingen

## **2.2 RFLP-Analysen**

Die in den RFLP-Analysen verwendeten Sonden und ihre Eigenschaften zeigt Tab. 2-4. Alle Sonden waren DIG-markiert. Die genspezifischen Sonden pRZ25 und pRZ18 wurden dankenswerterweise von Dr. B. Oberwalder, Institut für Pflanzenbiochemie, Universität Tübingen zur Verfügung gestellt.

Tab. 2-4: RFLP-Sonden – Eigenschaften. Alle Sonden DIG-markiert

| Sonde               | Typ            | Besondere Eigenschaften                                                                                                                                                               | Genhäufigkeit   | Bezugsquelle                                                              | Referenz                            |
|---------------------|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| (GATA) <sub>4</sub> | Oligonukleotid | —                                                                                                                                                                                     | hochrepetitiv   | Fresenius AG, Oberursel                                                   | —                                   |
| (GACA) <sub>4</sub> | Oligonukleotid | —                                                                                                                                                                                     | Hochrepetitiv   | Fresenius AG, Oberursel                                                   | —                                   |
| (GTG) <sub>5</sub>  | Oligonukleotid | —                                                                                                                                                                                     | hochrepetitiv   | Fresenius AG, Oberursel                                                   | —                                   |
| pRZ25               | genspezifisch  | frühere Bezeichnung: pRZ52<br>rDNA-Gene –<br>enthält einen großen Teil des 25 S und des<br>5,8 S rRNA-Gens aus <i>Cucurbita pepo</i><br>Größe : 2900 bp                               | mittelrepetitiv | Dr. B. Oberwalder,<br>Inst. f. Pflanzenbiochemie,<br>Universität Tübingen | TORRES 1985                         |
| pRZ18               | genspezifisch  | frühere Bezeichnung: pRZ83<br>rDNA-Gene –<br>enthält das 18 S rRNA-Gen sowie 400 bp des<br>Aufwärts- und 100 bp des Abwärts-Bereiches aus<br><i>Cucurbita pepo</i><br>Größe : 2400 bp | mittelrepetitiv | Dr. B. Oberwalder,<br>Inst. f. Pflanzenbiochemie,<br>Universität Tübingen | TORRES-RUIZ<br>und HEMLEBEN<br>1994 |

## 2.3 RAPD-PCR

Die in der RAPD-PCR verwendeten fünfzehn 10mer-Primer wurden als Chargen von 0,01 und 0,05 µmol, PSF-gereinigt und lyophilisiert von MWG Biotech AG, Ebersberg bezogen (Tab. 2-5).

Tab. 2-5: 10mer-Primer für die RAPD-PCR-Versuche.

| Arbeitsbezeichnung | Ursprungsbezeichnung | Sequenz          | Referenz                  |
|--------------------|----------------------|------------------|---------------------------|
| STR-R1             | OP-G-06              | 5'-GTGCCTAACC-3' | KATZIR <i>et al.</i> 1996 |
| STR-R2             | UBC-212              | 5'-GCTGCGTGAC-3' |                           |
| STR-R3             | UBC-215              | 5'-TCACACGTGC-3' |                           |
| STR-R4             | UBC-250              | 5'-CGACAGTCCC-3' |                           |
| STR-R5             | UBC-300              | 5'-GGCTAGGGCG-3' |                           |
| STR-R6             | OP-A-02              | 5'-TGCCGAGCTG-3' | PARAN <i>et al.</i> 1997  |
| STR-R7             | OP-B-07              | 5'-GGTGACGCAG-3' |                           |
| STR-R8             | OP-B-08              | 5'-GTCCACACGG-3' |                           |
| STR-R9             | OP-B-10              | 5'-CTGCTGGGAC-3' |                           |
| STR-R10            | OP-C-06              | 5'-GAACGGACTC-3' |                           |
| STR-R11            | OP-C-07              | 5'-GTCCCGACGA-3' |                           |
| STR-R12            | OP-C-15              | 5'-GACGGATCAG-3' |                           |
| STR-R13            | AG-8                 | 5'-GGGATATCGG-3' | ZEID <i>et al.</i> 1997   |
| STR-R14            | AG-12                | 5'-ACGGTACCAG-3' |                           |
| STR-R15            | AG-14                | 5'-TGCTGCAGGT-3' |                           |

Die Abkürzungen der Ursprungsbezeichnungen leiten sich von den in den Referenzen genannten Herstellern der Primer ab:

OP = Operon: Operon Technologies Inc., Alameda, CA, USA;

UBC = NAPS / UBC: Nucleic Acid / Protein Service Unit at the University of British Columbia, Vancouver, BC, Kanada [John Hobbs];

AG = Ageri: Agricultural Genetic Engineering Research Institute, Kairo, Ägypten.

## 2.4 Geräte

Binokular

SMZ-2T, Nikon GmbH, Düsseldorf

Hybridisierungsöfen

Micro-4, Hybaid, Ashford, Middlesex, UK;

OV1, Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen

Elektrophoreseapparaturen für die Agarosegelelektrophorese

Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg;

MWG Biotech AG, Ebersberg;

Institut für Pflanzenbiochemie, Werkstatt, Universität Tübingen

#### Gefriertrocknungsanlagen

Bachofer GmbH, Reutlingen;

Edwards High Vacuum, Crawley, Sussex, UK;

Leybold Vakuum GmbH, Köln;

Vacuubrand GmbH & Co. Vakuumtechnik, Wertheim/Main

#### PCR-Thermocycler

UNO-Thermoblock 40, Biometra, Göttingen

#### Reinraumwerkbänke

BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Reutlingen;

CEAG Enviroco, Dortmund

#### Röntgenfilm-Entwickler

Fuji Photo Film Europe GmbH, Düsseldorf

#### Sicherheitswerkbank

Beck+Thies KG Reinraumtechnik, Langenfeld

#### Spektralphotometer

550 SE und Lambda 15,

Perkin-Elmer, Bodenseewerk Perkin-Elmer & Co. GmbH, Überlingen

#### Tischzentrifugen

Biofuge A und Biofuge pico, Heraeus-Christ GmbH, Osterode am Harz

#### Transilluminator (Wellenlänge $\lambda = 312 \text{ nm}$ )

Bachofer GmbH, Reutlingen

#### Trennkammern (für die Dünnschichtchromatographie)

Desaga GmbH, Wiesloch

#### Videodokumentation

S+L Gesellschaft für wissenschaftliche Geräte mbH, Heidelberg

#### Wärmeschränke

Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach

#### Wachstumsschränke

Rubarth Apparate GmbH, Hannover

## 2.5 Computersoftware

Programme zur phylogenetischen Auswertung der RAPD-PCR-Daten

- PAUP\*  
Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4.  
Swofford, D. L., 2000,  
Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA
- Popgene  
Microsoft Windows-based Freeware for Population Genetic Analysis.  
Version 1.31, 1999.  
Francis C. Yeh und Rong-cai Yang, University of Alberta, Kanada;  
Tim Boyle, Centre for International Forestry Research, Kanada

## 2.6 Materialien

DC-Platten

DC-Alufohlen, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 200 mm × 200 mm, Schichtdicke 0,2 mm  
Merck KGaA, Darmstadt

Filtrierpapiere

Schleicher & Schuell GmbH, Dassel

- Filtrierpapiere für Tests mit *Striga hermonthica*-Samen  
Grundfilter:  
Filtrierpapiere, qualitativ, Sorte 595, dünn, Cellulose,  
Rundfilter verschiedene Durchmesser  
Testfilter:  
Filtrierpapier, qualitativ, Sorte 0859, Cellulose  
zugeschnitten aus Bogen von 580 mm × 580 mm
- Filtrierpapiere für Cokulturen *Striga hermonthica* – *Sorghum bicolor* in Petrischalen  
Glasfaserfilter, GF6, Rundfilter Ø = 90 mm

Kulturgefäße – Magenta

Magenta Corporation, Chicago, IL, USA

Kulturröhrchen

Duran, dickwandig, Ø 24 mm, H 150 mm

Schott Glaswerke, Mainz;

dazu Alu-Verschlußkappen

Kultursubstrate für Pflanzen

- Kultursubstrat Einheitserde Typ ED 73  
Einheitserde Werkverband e.V., Sinntal-Jossa, Hameln, Fröndenberg, Uetersen

- Perligran G  
aus Perlite (Vulkangestein), pH-neutral, salzfrei, Gesamtporengröße 95 %  
Deutsche Perlite GmbH, Dortmund

Membran für Hybridisierung  
Nylonmembran Hybond-N (Nylon; 0,45 Micron)  
Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

Petrischalen

- Kunststoff, Polystyrol  
Ø 94 mm, H 16 mm und Ø 145 mm, H 20 mm  
Greiner GmbH, Frickenhausen
- Glas  
Ø 100 mm, H 20 mm  
Schott Glaswerke, Mainz

## 2.7 Chemikalien, Lösungsmittel und Enzyme

### 2.7.1 Chemikalien

Es wurden Chemikalien des Reinheitsgrades p. a. bzw. reinst verwendet, bezogen von:  
Merck KGaA, Darmstadt;  
Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe;  
Serva, Heidelberg;  
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

#### Chemikalien mit besonderer Bedeutung für die Arbeit:

Agarose, NEEO  
Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Ayapin, 1 mg/ml  
Labor Prof. Dr. Dr. h. c. K. Wegmann, Institut für Pflanzenbiochemie, Universität Tübingen

Benomyl, 50 % Wirkstoff  
Du Pont, Bad Homburg

Blockierungsreagens, für Nukleinsäure-Hybridisierung und -Nachweis  
Roche Diagnostics GmbH, vormals Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim

Chemilumineszenz-Substrat RTU CDP-*Star*<sup>TM</sup>  
Tropix, Bedford, MA, USA  
Vertrieb: Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt



Coniferylalkohol (4-Hydroxy-3-methoxy-zimtalkohol)  
Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2,6-Dimethyl-p-benzochinon (2,6-dimethyl-benzoquinone, 2,6-DMBQ), 99 %  
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

#### DNA-Längenstandards

alle Lösungen in 10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0

- DNA-Molekulargewichtsmarker II, DIG-markiert –  
λ-DNA mit Restriktionsenzym HindIII geschnitten,  
Gemisch von DNA-Fragmenten folgender Größen [bp]:  
125, 564, 2027, 2322, 4361, 6557, 9416, 23130
- DNA-Molekulargewichtsmarker VIII und XVI –  
50 µg ≡ 1 A<sub>260</sub>-Einheit; 250 µg/ml:  
DNA-Molekulargewichtsmarker VIII (0,019–1,114 kbp) –  
Gemisch von DNA-Fragmenten folgender Größen [bp]:  
19, 26, 34 (2 ×), 37, 67, 110, 124, 147, 190, 242, 320, 404, 489, 501, 692, 900, 1114;  
DNA-Molekulargewichtsmarker XVI (0,25–3 kbp) –  
Gemisch von DNA-Fragmenten folgender Größen [bp]:  
250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500, 2750, 3000

Roche Diagnostics GmbH, vormals Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim;  
jeweils verdünnt 1:1 mit Elektrophorese-Probenpuffer

#### GR 24, Keimungsstimulans

wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von:

Prof. Dr. P. Welzel, Institut für Organische Chemie, Universität Leipzig

#### L-Maackiain

Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

#### p-Nitrophenol

Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

#### p-Nitrophenyl-β-D-glucopyranosid, > 99 %

Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

#### Ostazin-Hydroxyethylcellulose

Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

#### PCR-Nukleotid-Mix

Na-Salze von dATP, dCTP, dGTP und dTTP, jeweils 10 mM in H<sub>2</sub>O bidest.

Roche Diagnostics GmbH, vormals Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim;

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Remazol-Brilliant-Blau, Farbstoffgehalt ca. 60 %;  
 Remazol-Brilliant-Blau-Xylan, Farbstoffgehalt ca. 13 %  
 beide Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Scopoletin (Aesculetin-6-methylether)  
 Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2,3,5-Triphenyl-tetrazoliumchlorid (TTC)  
 Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Trocknungsmittel  
 Blaugel, Kieselgel mit Feuchtigkeitsindikator, Ø 1–3 mm  
 Merck KGaA, Darmstadt

### 2.7.2 Lösungsmittel

p. a. und HPLC-grade für die Dünnschichtchromatographie:  
 Aceton, Diethylether, Ethanol, Ethylacetat, Methanol, Toluol  
 Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe;  
 Merck KGaA, Darmstadt

### 2.7.3 Enzyme

Die in den Exoenzym-Aktivitätstests eingesetzten Enzyme sind in Tab. 2-6 aufgeführt.

Tab. 2-6: Enzyme für Exoenzym-Aktivitätstests.

| Enzym                                                                  | EC       | aus Organismus                   | Aktivität | Hersteller                                        |
|------------------------------------------------------------------------|----------|----------------------------------|-----------|---------------------------------------------------|
| Endocellulase                                                          | 3.2.1.4  | <i>Penicillium citreo viride</i> | 0,56 U/mg | Serva, Heidelberg                                 |
| Polygalacturonase<br>in Mischung mit<br>Cellulase und<br>Hemicellulase | 3.2.1.15 | <i>Aspergillus niger</i>         | 0,55 U/mg | Serva, Heidelberg                                 |
| β-Glucosidase                                                          | 3.2.1.21 | Mandel ( <i>Prunus dulcis</i> )  | 7,7 U/mg  | Serva, Heidelberg                                 |
| Endoxylanase                                                           | 3.2.1.8  | <i>Trichoderma viride</i>        | 2,5 U/mg  | Fluka, Sigma-Aldrich<br>Chemie GmbH,<br>Steinheim |

Anti-Digoxigenin-AP (Alkalische Phosphatase), Fab-Fragmente  
 Reagens zum Nachweis Digoxigenin-markierter Verbindungen  
 Roche Diagnostics GmbH, vormals Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim

**Restriktionsenzyme**

BamHI, DraI, EcoRI, EcoRV, HindIII, KpnI und PstI

GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein;

Promega Corporation, Madison, WI, USA;

Roche Diagnostics GmbH, vormals Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim

**RNase A**

aus Rinderpankreas

Roche Diagnostics GmbH, vormals Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim

**Taq DNA-Polymerase**

Deoxynucleoside-triphosphate:DNA deoxynucleotidyltransferase, EC 2.7.7.7

aus *Thermus aquaticus* BM, rekombinant (*E. coli*), 1 U/ $\mu$ l

Roche Diagnostics GmbH, vormals Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim

**2.7.4 Puffer, Lösungen, Testsysteme und Medien**

Falls nicht anders angegeben, wurden die Puffer, Lösungen und Medien mit VE-Wasser angesetzt.

**2.7.4.1 Puffer und Lösungen****2,6-DMBQ-Stammlösung**

$10^{-3}$  M in H<sub>2</sub>O bidest.

**Anti-DIG-Lösung**

Anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragmente in Puffer 2 (Verdünnung 1:5000)

**CTAB-DNA-Isolierungspuffer**

0,1 M Tris/HCl; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 2 % (w/v) Cetyltrimethylammoniumbromid; pH 8,0; in H<sub>2</sub>O bidest.

**Denaturierungslösung**

0,4 M NaOH; 0,6 M NaCl; in H<sub>2</sub>O bidest.

**Denhardts Lösung (100 ×)**

2 g Polyvinylpyrrolidon PVP 40; 2 g Rinderserumalbumin (BSA); 2 g Ficoll; ad 1 l H<sub>2</sub>O bidest.

**Elektrophorese-Probenpuffer**

60 % (w/v) Glycerin; 0,5 × NEB-Puffer; 20 mM EDTA; 0,2 % (w/v) SDS; 0,6 % (w/v) Bromphenolblau

### Farbreagentien für die Dünnschichtchromatographie

- nach KREBS *et al.* (1967):  
Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (Nr. 15),  
Iod-Kaliumiodid-Färbung (Nr. 128 und 129),  
Kaliumpermanganat-Schwefelsäure-Reagens (Nr. 145),  
Molybdatophosphorsäure-Reagens (Nr. 158),  
Vanillin-Schwefelsäure-Reagens (Nr. 247)
- kommerziell bezogen:  
Phosphomolybdat Spray  
Merck KGaA, Darmstadt

GR 24-Stammlösung, 3000 ppm  
3 mg GR 24 in 1 ml Methanol p. a.

### Hybridisierungslösungen

jeweils 400 ng Digoxigenin-markierter Sonde in 10 ml Prähybridisierungslösung

### Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie

- Laufmittel 1  
Ethylacetat:Ameisensäure:2N HCl 85:9:6 (v/v/v)
- Laufmittel 2  
Ethylacetat:H<sub>2</sub>O bidest.:Ameisensäure:HCl konz. 85:8:6:1 (v/v/v/v)
- Laufmittel 3  
Ethylacetat:Hexan 9:1 (v/v)
- Laufmittel 4  
2-Butanol:Ethanol:H<sub>2</sub>O bidest. 4:4:2 (v/v/v)
- Laufmittel 5  
Ethylacetat:Methanol:Hexan 7:2:1 (v/v/v)
- Laufmittel 6  
Ethylacetat (100 %)
- Laufmittel Vorchromatographie  
Chloroform:Methanol 1:1 (v/v)

### Lösung 7

0,5 % (w/v) Blockierungsreagens in 6 × SSC

### Lösung 8

250 ml 20 × SSPE; 50 ml 100 × Denhardts Lösung; 10 ml 10 % (w/v) SDS; 690 ml H<sub>2</sub>O bidest.

### NEB (-Puffer) (10 ×)

1 M Tris; 9 mM EDTA; 125 mM Natriumacetat; pH 8,1 mit Eisessig eingestellt

**Neutralisierungslösung**

0,5 M Tris/HCl; 1,5 M NaCl; pH 7,5; in H<sub>2</sub>O bidest.

**Prähybridisierungslösung**

1 % (w/v) Blockierungsreagens; 0,1 % (w/v) N-Laurylsarcosin; 0,02 % (w/v) SDS; 5 × SSC

**Puffer 1**

0,1 M Maleinsäure; 150 mM NaCl; pH 7,5; in H<sub>2</sub>O bidest.

**Puffer 2**

1 % (w/v) Blockierungsreagens; Puffer 1

**Puffer 3**

0,1 M Tris/HCl; 0,1 M NaCl; pH 9,5; in H<sub>2</sub>O bidest.

**Saline**

0,9 % (w/v) NaCl in H<sub>2</sub>O bidest.; autoklaviert

**Spermidin-Stammlösung**

40 mM Spermidin in H<sub>2</sub>O bidest.; sterilfiltriert

**SSC (20 ×)-Puffer**

3 M NaCl; 0,3 M Trinatriumcitrat; pH 7,0; in H<sub>2</sub>O bidest.

0,5 × SSC, 5 × SSC und 6 × SSC sind entsprechende Verdünnungen aus 20 × SSC mit H<sub>2</sub>O bidest.

**SSPE (20 ×)-Puffer**

3 M NaCl; 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 20 mM EDTA; pH 7,4 mit NaOH eingestellt

**TE-Puffer**

10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0; in H<sub>2</sub>O bidest.; autoklaviert

**TTC-Lösung**

1 % (w/v) 2,3,5-Triphenyl-tetrazoliumchlorid (TTC) in H<sub>2</sub>O bidest.

**Waschlösung**

0,5 % (w/v) SDS; 0,5 × SSC

**Waschlösung A**

50 mM EDTA; 2 × SSC; pH 8,0

**Waschlösung B**

0,1 % SDS (w/v); 2 × SSC

**Waschlösung C**

0,1 % SDS (w/v); 0,2 N NaOH

**2.7.4.2 Exoenzym-Testsysteme****Endocellulase-Test**

- 1 mg/ml Ostazin-Hydroxycellulose in 50 mM Citronensäure/NaOH-Puffer; pH 4,8
- Ethanol:Aceton 2:1 (v/v)

**Endoxylanase-Test**

- 0,2 mg/ml Remazol-Brilliant-Blau-Xylan (= RBB-Xylan) in 50 mM Natriumacetatpuffer; pH 5,0
- 96%iger Ethanol
- 0,1 mM Remazol-Brilliant-Blau (= RBB) in 50 mM Natriumacetatpuffer; pH 5,0

**β-Glucosidase-Test**

- 0,1 mM p-Nitrophenyl-β-D-glucopyranosid (= pNPG) in 50 mM Natriumacetatpuffer; pH 5,0
- 0,1 mM p-Nitrophenol (= pNP) in 250 mM Glycin/NaOH-Puffer; pH 10,8 (für Eichgerade)

**Polygalacturonase-Test**

- 1 % (w/v) Polygalacturonsäure in 50 mM Natriumacetatpuffer; pH 5,0
- 0,5 N HCl
- 0,1 M 2-Thiobarbitursäure in H<sub>2</sub>O bidest.
- 10 mM Galacturonsäure in 50 mM Natriumacetatpuffer; pH 5,0

**2.7.4.3 Medien****Gelbildner****Bacto-Agar**

Difco Laboratories, Detroit, MI, USA

**Gelrite®**

Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

## **Versuchsmedien**

Wasseragar, 0,7 und 1%ig  
0,7 % bzw. 1 % (w/v) Agar in H<sub>2</sub>O bidest.; autoklaviert

## **Pflanzen-Nährmedien**

### **Pflanzenhormone**

Gibberellinsäure (GA<sub>3</sub>),  
Indol-3-essigsäure (IES) und  
Zeatin-ribosid, trans-Isomer, 95 %  
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

### **Hoaglands Pflanzennährmedium**

Hoaglands Nr. 2 Basale Salzmischung nach HOAGLAND und ARNON (1950)  
115,03 mg/l (NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 2,86 mg/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 656,4 mg/l Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; 80 µg/l CuSO<sub>4</sub> • 5 H<sub>2</sub>O;  
5,32 mg/l Fe-tartrat • 2 H<sub>2</sub>O; 240,76 mg/l MgSO<sub>4</sub>; 1,81 mg/l MgCl<sub>2</sub> • 4 H<sub>2</sub>O; 16 µg/l MoO<sub>3</sub>;  
606,6 mg/l KNO<sub>3</sub>; 0,22 mg/l ZnSO<sub>4</sub> • 7 H<sub>2</sub>O; 1,6 g Mischung für 1 l Medium; pH 4,7  
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

### **Nährmedium für *In vitro*-Kulturen**

MS-Medium nach MURASHIGE und SKOOG (1962)  
mit optionaler Zugabe von Phytohormonen (Tab. 2-7)

### **Pilz-Kulturmedien**

Alle Festmedien: zusätzlich 15 g/l Agar bzw. 2,5 g/l Gelrite

#### **HM-Medium**

10 g Malzextrakt; 4 g Hefeextrakt; 4 g Glucose; ad 1 l H<sub>2</sub>O; pH 5,5; autoklaviert

#### **MB-Medium (für *Botrytis cinerea*)**

20 g/l Malzextrakt; pH 5,5; autoklaviert

Tab. 2-7: Zusammensetzung des MS-Mediums nach MURASHIGE und SKOOG (1962).  
Zugabe von Phytohormonen optional

| Klasse                    | Substanzen                                           | mg/ml |
|---------------------------|------------------------------------------------------|-------|
| Anorganische Verbindungen | $\text{NH}_4\text{NO}_3$                             | 1650  |
|                           | $\text{KNO}_3$                                       | 1900  |
|                           | $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$           | 440   |
|                           | $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$           | 370   |
|                           | $\text{KH}_2\text{PO}_4$                             | 170   |
| Spurenelemente            | $\text{H}_3\text{BO}_3$                              | 6,2   |
|                           | $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$           | 22,3  |
|                           | $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$           | 10,59 |
|                           | KI                                                   | 0,83  |
|                           | $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ | 0,25  |
|                           | $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$           | 0,025 |
|                           | $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$           | 0,025 |
|                           | $\text{Na}_2\text{EDTA}$                             | 37,2  |
|                           | $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$           | 27,8  |
| Cosubstrate               | Nicotinsäure                                         | 0,5   |
|                           | Pyridoxin • HCl                                      | 0,5   |
|                           | Thiamin • HCl                                        | 0,1   |
| Aminosäure                | L-Glycin                                             | 2     |
| Zucker                    | Saccharose                                           | 20000 |
| Gelbildner                | Gelrite                                              | 2,5   |
| Phytohormone              | $\text{GA}_3$                                        | ●     |
|                           | IES                                                  | ●     |
|                           | Zeatin-ribosid                                       | ●     |
| pH-Wert                   |                                                      | 6,0   |

● = Zugabe optional, siehe Kapitel 3.3.4.3

MS-Medium autoklaviert, Phytohormone sterilfiltriert, hergestellt mit  $\text{H}_2\text{O}$  bidest.



### 3 METHODEN

#### 3.1 Allgemeine Verfahren

##### 3.1.1 Sterilisation

Geräte, Materialien und Lösungen wurden entweder 20 min bei  $T = 121\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 1 bar Überdruck autoklaviert oder (wenn möglich) 4 h bei  $T = 180\text{ }^{\circ}\text{C}$  hitzesterilisiert.

##### 3.1.2 Bestimmung der Keimfähigkeit der Samen im TTC-Test

Neben der Bestimmung der Keimungsrate in Petrischalen-Keimungstests (Kap. 3.2.3 und 3.3.2.2) wurde darüber hinaus versucht, die Keimfähigkeit der Samen von *Sorghum bicolor* und *Striga hermonthica* auch mittels TTC-Test (KUHN und JERCHEL 1941, EPLEE und NORRIS 1987) zu bestimmen. Das farblose TTC, 2,3,5-Triphenyl-tetrazoliumchlorid, auch als Tetrazoliumrot bezeichnet, wird durch in lebensfähigen Samen vorhandene Reduktionsäquivalente und mitochondriale Dehydrogenasen zu rotem, wasserunlöslichem Formazan reduziert (Abb. 3-1). Der Test weist also eine Stoffwechselaktivität nach, die nicht unbedingt mit der Keimfähigkeit der Samen gleichzusetzen ist. Diese vereinfachende Gleichsetzung wird in der Praxis jedoch vielfach gemacht, und der TTC-Test als Nachweis der Lebens- und Keimfähigkeit von Samen verwendet.

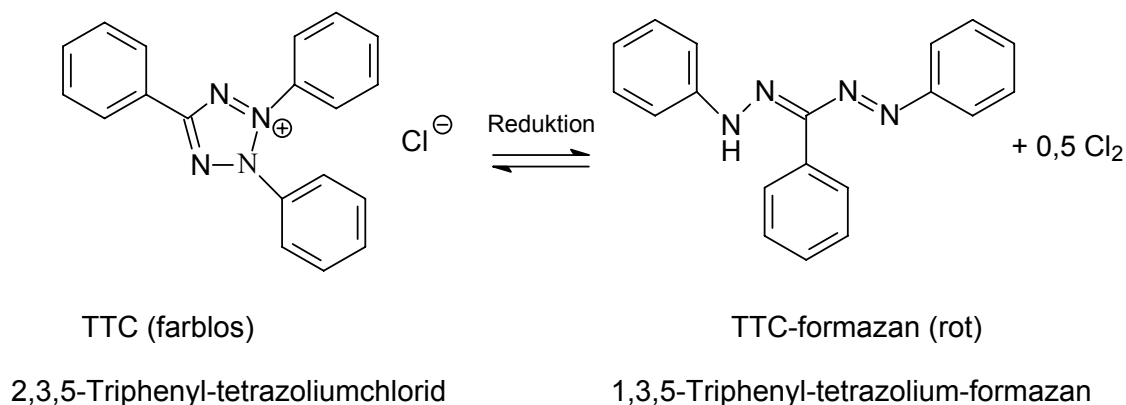


Abb. 3-1: Vitalitätsnachweis von Samen mit dem TTC-Test – Reduktion des farblosen TTC zum roten Formazan.

Die Samen von *S. bicolor* und *S. hermonthica* wurden zuerst oberflächensterilisiert (siehe Kap. 3.2.1 und 3.3.1). Danach wurden die Samen in 1%iger TTC-Lösung im Schnappdeckelglas inkubiert. Für Samen von *S. bicolor* betrug die Inkubationsdauer ein bis

vier Tage, für *S. hermonthica*-Samen zehn Tage. Danach wurden die Samen mit einem Faltenfilter von der Lösung abgetrennt. Anschließend wurde unter dem Binokular die Zahl der (deutlich) rotgefärbten Samen im Auflicht und die Gesamtzahl an Samen im Durchlicht bestimmt. Sorghum-Samen wurden auch halbiert, um die (rote) Anfärbung des Embryos sichtbar zu machen. Rotgefärbte Samen wurden als TTC-positiv eingestuft.

### **3.2 *Sorghum bicolor* und Pearl-Millet (*Pennisetum glaucum*)**

#### **3.2.1 *Oberflächensterilisation der Samen von Sorghum und Millet***

Die Samen wurden 10 min in 20 ml 0,125 % (w/v) Benomyl (50 % Wirkstoff) geschüttelt. Danach wurden die Samen 15 sec in 20 ml 70%igem Ethanol geschüttelt. Es folgte 20minütiges Schütteln in 20 ml 2,5 % (v/v) NaOCl, versetzt mit einem Tropfen Tween 20. Anschließend wurden die Samen viermal 3 min mit je 20 ml sterilem H<sub>2</sub>O bidest. gewaschen.

#### **3.2.2 *Anzucht für In vitro-Versuche und für Exsudatgewinnung***

Oberflächensterilisierte Samen von Sorghum und Millet wurden zur Keimung auf feuchtem Cellulose-Filtrierpapier Sorte 595 (Filtrierpapier autoklaviert, steriles H<sub>2</sub>O bidest.) in mit Parafilm verschlossenen Petrischalen (Glas, Ø 100 mm, hitzesterilisiert) inkubiert. Die Inkubation erfolgte im Wachstumsschrank bei T = 28 °C und 16 h Licht (Leuchtstoffröhren). Gekeimte Samen mit Wurzel und ausgebildeten, grünen Kotyledonen wurden weiterverwendet.

#### **3.2.3 *Bestimmung der Keimungsrate***

Jeweils 10–40 Samen der verschiedenen Varietäten wurden wie oben beschrieben gekeimt. Das Verhältnis von gekeimten Samen zur Samengesamtzahl in den Petrischalen wurde bestimmt.

#### **3.2.4 *Identifizierung von Exoenzym-beeinflussenden Stoffen***

##### **3.2.4.1 Gewinnung von Sorghum-Wurzelexsudaten**

Untersucht wurden Wurzelexsudate der Sorghum-Varietäten IS-9830, Framida, DS-1195, Seredo, IS-1037 und E-36-1. Die Keimlinge wurden auf Perligran G im Gewächshaus

angezogen. Eine 28 Tage alte Pflanze jeder Varietät wurde aus dem Kultursubstrat herausgenommen und die Perligran-Partikel vorsichtig von den Wurzeln entfernt. Die Wurzelballen jeder Pflanze wurden in jeweils 40 ml H<sub>2</sub>O bidest. getaucht und 5 min geschüttelt. Die Lösungen wurden durch Glaswolle filtriert und dann bei T = -70 °C eingefroren. Danach wurden sie über Nacht lyophilisiert. Das gefriergetrocknete Material wurde in 2 ml H<sub>2</sub>O bidest. resuspendiert. Aliquots hieraus wurden in den nachfolgenden Enzymaktivitätstests eingesetzt. Das Frischgewicht der Wurzeln, die für die Exsudatgewinnung verwendet worden waren, wurde bestimmt.

#### 3.2.4.2 Test auf Beeinflussung der Aktivität von Exoenzymen

Die gewonnenen Exsudate wurden in verschiedenen Enzymtestsystemen dahingehend untersucht, ob sie die Aktivität folgender Enzyme positiv oder negativ beeinflussten: Endocellulase, Endoxylanase,  $\beta$ -Glucosidase und Polygalacturonase. Dazu wurde im jeweiligen Testsystem für alle Wurzelexsudat-Proben das zu untersuchende Exoenzym in einer bestimmten Konzentration und Aktivität vorgelegt. Diese Konzentration wurde vorab bestimmt und so eingestellt, daß im Vorversuch ohne Exsudate der Umsatz des Substrats gut zu verfolgen war und das Substrat soweit im Überschuß vorlag, daß eine etwaige Aktivitätssteigerung im Test noch meßbar wäre.

##### 3.2.4.2.1 *Endocellulase-Aktivitätstest*

Zur Bestimmung der Endocellulase (EC 3.2.1.4)-Aktivität wurde das Testsystem nach BIELY *et al.* (1985) angewandt. Das Substrat Ostazin-Hydroxyethylcellulose ist Cellulose, die mit dem roten Farbstoff Ostazin Brilliant Rot H-3B kovalent verknüpft worden ist. Das Substrat wird mit Endocellulase umgesetzt. Freigesetzte Cellulose-Fragmente (mit gekoppeltem Ostazin) werden vom Makromolekül durch Zentrifugation abgetrennt und bleiben im Überstand. Der Überstand wird bei  $\lambda = 550$  nm photometrisch vermessen. Dieser Test ist 16 bis 18mal sensitiver als der Nachweis reduzierender Gruppen mit 3,5-Dinitrosalicylsäure (BIELY *et al.* 1985). Da der Farbstoff Ostazin (unkonjugiert) nicht zu erhalten ist, erfolgt die Eichung durch die Umsetzung einer bestimmten Menge Ostazin-Hydroxyethylcellulose mit definierten Mengen des Enzyms Endocellulase.

### Testsystem

Es wurden 75 µl Exsudat oder Citronensäure-Puffer (= Kontrolle E) und 75 µl 50 µg/ml (28 mU/ml) Endocellulase in Citronensäure-Puffer (zusammen = Probe) mit 150 µl Ostazin-Hydroxyethylcellulose in Citronensäure-Puffer vermischt, geschüttelt und 15 min bei  $T = 30\text{ °C}$  inkubiert. Die Reaktion wurde mit 900 µl Ethanol:Aceton 2:1 (v/v) gestoppt (kurzes Schütteln). Danach wurden die Testansätze 10 min bei  $T = 4\text{ °C}$  inkubiert, anschließend 10 min bei  $3200 \times g$  in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und 1 ml des Überstandes bei  $\lambda = 550\text{ nm}$  photometrisch gegen die Kontrolle R (= 75 µl H<sub>2</sub>O bidest. und 75 µl Citronensäure-Puffer statt Probe) vermessen. Die Eichung erfolgte mit 75 µl einer von 1 bis 100 µg Enzym/ml variierenden Menge an Endocellulase in Citronensäure-Puffer plus 75 µl Citronensäure-Puffer statt Probe. Der lineare Anfangsbereich der Sättigungskurve wurde als Eichgerade verwendet.

#### *3.2.4.2.2 Endoxylanase-Aktivitätstest*

Zur Bestimmung der Endoxylanase (EC 3.2.1.8)-Aktivität wurde das Testsystem nach BIELY *et al.* (1985) angewandt. Mit dem blauen Farbstoff Remazol-Brilliant-Blau (RBB) gekoppeltes Xylan wird mit Endoxylanase umgesetzt. Freigesetzte Xylan-Fragmente (mit gekoppeltem RBB) werden vom Makromolekül durch Zentrifugation abgetrennt und bleiben im Überstand. Der Überstand wird bei  $\lambda = 595\text{ nm}$  photometrisch vermessen. Die Eichung erfolgt mit freiem RBB.

### Testsystem

Es wurden 100 µl Exsudat oder Natriumacetatpuffer (= Kontrolle E) und 100 µl 1 µg/ml (2,5 mU/ml) Endoxylanase in Natriumacetatpuffer (zusammen = Probe) mit 200 µl RBB-Xylan in Natriumacetatpuffer vermischt, geschüttelt und 15 min bei  $T = 30\text{ °C}$  inkubiert. Die Reaktion wurde mit 800 µl 96%igem Ethanol gestoppt (kurzes Schütteln). Danach wurden die Testansätze 10 min bei  $T = 4\text{ °C}$  inkubiert und 10 min bei  $3200 \times g$  in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurde 1 ml des Überstandes bei  $\lambda = 595\text{ nm}$  photometrisch gegen Kontrolle R (= 100 µl H<sub>2</sub>O bidest. und 100 µl Natriumacetatpuffer statt Probe) vermessen. Die Eichung erfolgte mittels Eichgerade mit 400 µl 0 bis 100 µM RBB in Natriumacetatpuffer statt Probe und RBB-Xylan.

#### 3.2.4.2.3 *β-Glucosidase-Aktivitätstest*

Zur Bestimmung der  $\beta$ -Glucosidase (EC 3.2.1.21)-Aktivität wurde das Testsystem nach DESHPANDE und ERIKSSON (1988) angewandt. Das farblose p-Nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranosid (= pNPG) wird mit  $\beta$ -Glucosidase umgesetzt, wobei p-Nitrophenol (= pNP) frei wird. pNP ist im alkalischen gelb und kann bei  $\lambda = 405$  nm photometrisch vermessen werden. Die Eichung erfolgt mit freiem pNP.

##### Testsystem

Es wurden 50  $\mu$ l Exsudat oder Natriumacetatpuffer (= Kontrolle E) und 50  $\mu$ l 0,1 mg/ml (0,77 U/ml)  $\beta$ -Glucosidase in Natriumacetatpuffer (zusammen = Probe) mit 800  $\mu$ l pNPG in Natriumacetatpuffer vermischt, geschüttelt und 15 min bei  $T = 40$  °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100  $\mu$ l  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung (pH muß alkalisch sein) gestoppt (kurzes Schütteln). 1 ml der Lösung wurden bei  $\lambda = 405$  nm photometrisch gegen Kontrolle R (= 50  $\mu$ l  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. und 50  $\mu$ l Natriumacetatpuffer statt Probe) vermessen. Die Eichung erfolgte mittels Eichgerade mit 0 bis 70  $\mu$ M pNP. 1 ml pNP-Lösung in Glycinpuffer wurde geschüttelt, 15 min bei  $T = 40$  °C inkubiert und bei  $\lambda = 405$  nm photometrisch vermessen.

#### 3.2.4.2.4 *Polygalacturonase-Aktivitätstest*

Zur Bestimmung der Polygalacturonase (EC 3.2.1.15)-Aktivität wurde das Testsystem nach AYERS *et al.* (1966) und SHERWOOD (1966) angewandt. Polygalacturonase setzt aus Pektin Mono- und Oligogalacturonsäuren frei. Diese werden durch Erhitzen zu reaktiven Carbonylverbindungen (Glyoxal, Malondialdehyd u. ä.) abgebaut. Solche reaktiven Carbonylverbindungen bilden mit Thiobarbitursäure einen roten Farbstoffkomplex, dessen genaue Struktur nicht bekannt ist. Die Komplexbildung kann bei  $\lambda = 510$  nm photometrisch vermessen werden (NEUKOM 1960, ALBERSHEIM *et al.* 1960).

##### Testsystem

Es wurden 50  $\mu$ l Exsudat oder Natriumacetatpuffer (= Kontrolle E) und 50  $\mu$ l 20  $\mu$ g/ml (27,5 mU/ml) Polygalacturonase in Natriumacetatpuffer (zusammen = Probe) mit 500  $\mu$ l 1 % (w/v) Polygalacturonsäure in Natriumacetatpuffer vermischt, geschüttelt und 3 h bei  $T = 30$  °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 600  $\mu$ l 0,5 N HCl gestoppt (kurzes Schütteln). Nach Zugabe von 120  $\mu$ l 0,1 M Thiobarbitursäure wurden die Testansätze 1 h im kochenden

Wasserbad inkubiert. Nach 20minütiger Zentrifugation bei  $14000 \times g$  in der Tischzentrifuge wurde 1 ml des Überstandes bei  $\lambda = 510 \text{ nm}$  photometrisch gegen Kontrolle R (= 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  bidest. und 50  $\mu\text{l}$  Natriumacetatpuffer statt Probe) vermessen. Die Eichung erfolgte mittels Eichgerade mit 600  $\mu\text{l}$  0 bis 10 mM Galacturonsäure in Natriumacetatpuffer statt Probe und Polygalacturonsäure.

### 3.2.5 Identifizierung von Phytoalexinen aus der Wurzel von *Sorghum bicolor*-Varietäten

Bei der Suche nach Phytoalexinen macht man sich den Umstand zunutze, daß Phytoalexine nicht nur im Kontakt mit Phytoparasiten, sondern beispielsweise auch im Kontakt mit Hefezellwandbestandteilen und Pilzen bzw. Pilzsporen elicitiert werden. Der Nachweis von Phytoalexinen kann durch mikrobiologische Detektionsmethoden erfolgen. Anwendung fand hier die Bioautographie unter Einsatz von Pilzsporen. Pilze, die sensitiv auf bestimmte Phytoalexine reagieren, zeigen auf einem Festmedium in dem Bereich, wo Phytoalexine vorhanden sind, hellere Zonen verminderten Wachstums, sogenannte Hemmzonen bzw. Hemmhöfe (HOMANS und FUCHS 1970, FREY und ZIELOFF 1993). Untersucht wurden Exsudate und Extrakte von *Sorghum bicolor*-Wurzeln, unbehandelt oder nach Kontakt mit Elicitoren. Als Kontrollen wurden  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. und das Fungizid Benomyl eingesetzt. Darüber hinaus wurden Stoffe getestet, die früher schon als Phytoalexine charakterisiert worden waren: L-Maackiain aus Kichererbse (*Cicer arietinum*) in Reaktion auf *Orobanche crenata*, Coniferylalkohol aus Lein (*Linum usitatissimum*) in Reaktion auf den Pilz *Melampsora lini*, Scopoletin und Ayapin aus Sonnenblume (*Helianthus annuus*) in Reaktion auf *Orobanche cumana*.

#### 3.2.5.1 Pilzanzucht und Gewinnung von Pilzsporen

Die Arbeiten mit Pilzen und Pilzsporen fanden zur Vermeidung von Kontaminationen in einer Sicherheitswerkbank statt. Unter sterilen Bedingungen wurden die Pilze aus kühlgelagerten Stammkulturen mit einer Impföse auf Festmedium in Petrischalen überimpft, oder es wurden aus dem Agar der Stammplatte Zylinder ausgestanzt und auf neues Festmedium überführt. Verwendet wurde HM-Medium, für *Botrytis cinerea* MB-Medium. Die Inkubation erfolgte bei RT im Dunkeln. War der Pilz in der Petrischale gut angewachsen, wurde das Pilzmyzel mit Saline, die mit einem Tropfen Tween 80 versetzt worden war, vom Agar abgespült und durch Glaswolle filtriert.

### 3.2.5.2 Bestimmung des Sporentiters und Einstellen der Sporensuspension

Die Zahl der Pilzsporen wurde mithilfe einer Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt. Die gewünschte Dichte der Sporensuspension wurde durch entsprechende Verdünnung mit Saline eingestellt.

### 3.2.5.3 Elicitierung und Gewinnung von Sorghum-Wurzelexsudaten und -extrakten

Die jeweils in Klammern angegebenen Bezeichnungen beschreiben die vorangegangenen Behandlungsschritte der untersuchten Proben. Folgende Nomenklatur wurde verwendet:

Varietät / Elicitor / Probenart / Resuspendieren bei Extrakten

|                 |                                                                                                                                    |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Elicitor:       | A = Pilzsporen, H = Hefezellwand, K = Kontrolle                                                                                    |
| Probenart:      | Wurzeln nach Elicitierung inkubiert in A = Aceton, W = H <sub>2</sub> O bidest.<br>oder es wurde E = ein Wurzelextrakt hergestellt |
| Resuspendieren: | nur bei Wurzelextrakten –<br>Proben resuspendiert in A = Aceton, W = H <sub>2</sub> O bidest.                                      |

In Perligran G gewachsene, 28 Tage alte *Sorghum bicolor*-Pflanzen der Varietäten 555, Framida, IS-9830, E-36-1, M-35-1 und IS-1037 wurden dem Kultursubstrat entnommen und noch anhaftende Perligran-Partikel vorsichtig entfernt. Anschließend wurden die Wurzelballen einzelner Pflanzen drei Tage inkubiert in jeweils 40 ml

- Pilzsporensuspension von *Aspergillus niger* ( $1-2 \times 10^5$  Sporen/ml) (Elicitor: A),
- Suspension von Hefezellwandbestandteilen in H<sub>2</sub>O bidest. (1 mg/ml) (Elicitor: H) und
- H<sub>2</sub>O bidest. als Kontrolle (Elicitor: K).

Als weitere Kontrollen wurden unbehandelte Pflanzen direkt aus den Gewächshauskulturen eingesetzt. Die Wurzeln der Pflanzen, die in der Pilzsporensuspension oder in der Suspension mit Hefezellwandbestandteilen inkubiert worden waren, wurden nach der Inkubation zunächst 1 min in H<sub>2</sub>O bidest. gewaschen. Alle Wurzeln (jew. 100–200 mg FG) wurden 30 sec in Aceton (Probenart: A) und dann 30 min in H<sub>2</sub>O bidest. (Probenart: W) inkubiert. Danach wurden die Wurzeln zunächst bei T = -70 °C gelagert und später unter flüssigem Stickstoff im Mörser homogenisiert. Das gewonnene Pulver wurde in Reaktionsgefäße überführt und mit der gleichen Menge (v/v) Aceton versetzt. Die Proben wurden 8 h geschüttelt und danach 30 min bei  $7000 \times g$  in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und 30 min bei  $14.000 \times g$  zentrifugiert. Die Überstände der zweiten Zentrifugation wurden anschließend aliquotiert und gefriergetrocknet. Die Lyophilisate

wurden sowohl in Aceton als auch in H<sub>2</sub>O bidest. resuspendiert (Probenart: E und Resuspendieren: A bzw. W).

#### 3.2.5.4 Dünnschichtchromatographie

Die Extraktionsproben (Probenart: E) von Elicitor-inkubierten Pflanzen und Kontrollen wurden in der Dünnschichtchromatographie (DC) aufgetrennt. Als stationäre Phase diente Kieselgel 60 mit Fluoreszenzindikator F<sub>254</sub> auf Alufolie. Die Schichtdicke betrug 0,2 mm. Die DC-Platten wurden zunächst ohne Proben vorchromatographiert, um etwaige Rückstände auf den DC-Platten zu beseitigen. Verwendet wurde hierzu das Laufmittel zur Vorchromatographie, Chloroform:Methanol 1:1 (v/v). Nach der Trocknung der DC-Platten wurden jeweils 5 µl der Proben auf eine DC-Platte tüpfelweise an der Startlinie aufgebracht. Die DC-Läufe wurden mit folgenden Laufmitteln als mobile Phase durchgeführt:

- Laufmittel 1: Ethylacetat:Ameisensäure:2N HCl 85:9:6 (v/v/v),
- Laufmittel 2: Ethylacetat:H<sub>2</sub>O bidest.:Ameisensäure:HCl konz. 85:8:6:1 (v/v/v/v).

Nach dem DC-Lauf wurden Substanzflecken visuell aufgrund ihrer Farbe bei Tageslicht, sowie unter UV-Licht der Wellenlängen  $\lambda = 254$  und  $366$  nm als Fluoreszenz und bei  $\lambda = 254$  nm als Fluoreszenzlöschung des Indikators der stationären Phase registriert.

Die Charakterisierung der Substanzen erfolgte anhand ihres R<sub>f</sub>-Werts (R<sub>f</sub> – Abk. für engl. *Relate to front*) im Chromatogramm.

Für den R<sub>f</sub>-Wert gilt: 
$$R_f = \frac{\text{Distanz Start - Fleck}}{\text{Distanz Start - Front}}$$

#### 3.2.5.5 Bioautographie

Zur Etablierung eines geeigneten Testsystems wurden verschiedene Substanzen, die als Phytoalexine bekannt sind, und das Fungizid Benomyl auf ihre Fähigkeit überprüft, das Wachstum verschiedener Pilzstämme zu hemmen:

- Benomyl (50 % Wirkstoff), 1,5 mg/ml in H<sub>2</sub>O bidest.,
- Ayapin, 1 mg/ml in Methanol, HPLC-grade,
- Coniferylalkohol, 1 mg/ml in Methanol, HPLC-grade,
- L-Maackiain, 1 mg/ml in Methanol, HPLC-grade,
- Scopoletin, 1 mg/ml in H<sub>2</sub>O bidest.



In den anschließenden Tests wurden Exsudate und Extrakte von Sorghum-Wurzeln untersucht. Jeweils 10 oder 20 µl der Proben wurden mit Glaskapillaren punktförmig auf eine DC-Platte getupft. Die weiteren Arbeitsschritte wurden im Abzug durchgeführt. Die DC-Platte wurde mit HM-Festmedium (noch warm und flüssig) im Zick-zack horizontal, dann vertikal besprüht. Anschließend wurde die Platte mit einer Pilzsporensuspension ebenfalls im Zick-zack besprüht. Verwendet wurden Sporensuspensionen folgender Pilzarten:

- *Aspergillus niger*,  $2-3 \times 10^5$  Sporen/ml,
- *Botrytis cinerea*,  $3-4 \times 10^5$  Sporen/ml,
- *Cladosporium herbarum* (F92),  $2 \times 10^6$  Sporen/ml,
- *Neurospora crassa*,  $3,2 \times 10^5$  Sporen/ml.

Anschließend wurde die DC-Platte in einer Trennkammer mit hoher Luftfeuchte sieben Tage im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Platte auf Hemmzonen bzw. Hemmhöfe untersucht.

### **3.2.6 Bestimmung des Ligningehalts von Sorghum-Wurzeln mittels $^{13}\text{C}$ -Festkörper-Kernspinresonanz (NMR)-Spektroskopie**

Für einige Sorghum-Varietäten wurden mechanische Resistenzfaktoren postuliert. Eine mögliche Grundlage hierfür wäre z. B. eine Verholzung der Zellwände. Durch die Auflagerung von Lignin könnte das Haustorium von *Striga* möglicherweise nicht oder nur weniger effizient in das Wirtsgewebe eindringen. Der *Striga*-Befall der Wirtspflanzen wäre in Folge geringer bzw. die Pflanzen völlig resistent. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich der Ligningehalt von Wurzelproben verschiedener Sorghum-Varietäten mithilfe der  $^{13}\text{C}$ -Festkörper-NMR-Spektroskopie ermitteln lässt. Junge Wurzeln der *S. bicolor*-Varietäten N-13, 555, Framida, IS-9830, Seredo und E-36-1 wurden zur Untersuchung herangezogen. Die Sorghum-Pflanzen wuchsen auf Versuchsfeldern in Cinzana, Mali (Westafrika). 30 Tage alte Pflanzen wurden möglichst mit ihrem gesamten Wurzelwerk ausgegraben. Der Wurzelballen wurde gewaschen und anschließend getrocknet. Von den Wurzeln wurden jeweils die ersten 10 cm von der Spitze her (jüngere Wurzelteile) abgeschnitten. Diese Wurzelteile wurden zerkleinert und anschließend in einer Kugelmühle mit Wolfram-Karbid-Kugeln pulverisiert. Jeweils 200 mg der pulverisierten Wurzelproben der verschiedenen Sorghum-Varietäten wurde in einem 300 MHz-Festkörper-NMR-Spektrometer untersucht.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren der Wurzelproben wurden erstellt. Ebenfalls wurde ein Spektrum von einem kommerziellen Ligninpräparat aus Fichtenholz aufgenommen. Dieses Spektrum konnte als Standard verwendet werden, da die Lignine verschiedenster Herkunft fast identische NMR-Spektren

besitzen<sup>6</sup>. Die <sup>13</sup>C-Spektren wurden dahingehend überprüft, ob sich die charakteristischen Peaks aus dem Ligninspektrum auch in den Spektren der Sorghum-Wurzelproben wiederfinden ließen. Darüber hinaus wurden die Spektren der Wurzelproben auch auf Unterschiede zwischen den einzelnen Sorghum-Varietäten untersucht. So sollte festgestellt werden, ob einzelne Varietäten, z. B. N-13, für die mechanische Resistenzfaktoren postuliert worden waren, Besonderheiten im Spektrum zeigten oder ob Unterschiede zwischen resistenten und suszeptiblen Varietäten auftraten.

### 3.3 *Striga hermonthica*

Alle Arbeiten zur Oberflächensterilisation, Konditionierung, Keimung, Haustorialentwicklung und zur Anlage von *In vitro*-Kulturen wurden unter sterilen Bedingungen in einer Reinraumwerkbank durchgeführt. Petrischalen, Arbeitsgeräte und Filtrierpapiere wurden steril bezogen bzw. wurden sterilisiert.

#### 3.3.1 Oberflächensterilisation der Samen

Für die Anlage von Gewebekulturen und für die Durchführung von Keimungstests war es wichtig, saubere *Striga hermonthica*-Samen zur Verfügung zu haben, d. h. Samen, die zuvor auch von Pilzen bzw. Pilzsporen und Bakterien befreit worden waren:

- a) Für die Verwendung zur Anlage von Gewebekulturen wurden folgende Reinigungsschritte in Plastikröhrchen durchgeführt: Die Samen wurden in kleine Säckchen aus Gaze-Stoff gefüllt und 30 sec in 10 ml 70%igem Ethanol geschüttelt. Danach folgte 20minütiges Schütteln in 10 ml 5 % (v/v) NaOCl, versetzt mit einem Tropfen Tween 20. Anschließend wurden die Samen dreimal 2 min mit je 10 ml sterilem H<sub>2</sub>O bidest. gewaschen.
- b) Für die Verwendung in Keimungstests wurden die Samen wie folgt gereinigt: Ebenfalls in Gaze-Stoffsäckchen wurden die Samen 4 min in 10 ml 70%igem Ethanol geschüttelt, dann in 10 ml sterilem H<sub>2</sub>O bidest. gewaschen, 12 min in 10 ml 1 % (v/v) NaOCl, versetzt mit einem Tropfen Tween 20, geschüttelt und abschließend fünfmal 3 min mit je 10 ml sterilem H<sub>2</sub>O bidest. gewaschen.

---

<sup>6</sup> K. Wegmann, Institut für Pflanzenbiochemie, Universität Tübingen, persönliche Mitteilung.

### 3.3.2 Keimung

Zur Optimierung der Keimung von *Striga hermonthica*-Samen wurden verschiedene Bedingungen getestet. Als Inkubationsgefäß bewährten sich Petrischalen aus Kunststoff, da dort im Gegensatz zu solchen aus Glas weniger Feuchtigkeit im Deckel kondensierte. Das Filtrierpapier am Boden blieb so gleichmäßig feucht. Die Samen für einen Test (etwa 200 bis 300 Stück) lagen jeweils auf einem kleinen, rechteckigen Stück Filtrierpapier (Cellulose, Sorte 0859) mit den ungefähren Abmessungen 1,5 cm × 1,5 cm („Testfilter“). Die Testfilter wurden dann auf einen „Grundfilter“ (Cellulose-Filtrierpapier Sorte 595, Rundfilter mit Ø 70 mm) aufgebracht. Dies hatte den Vorteil, daß mehrere der kleinen Testfilter in einer Petrischale inkubiert und Filter mit Bakterien- oder Pilzbefall leicht entfernt werden konnten.

#### 3.3.2.1 Konditionierung

Entscheidend für die Keimung von *S. hermonthica*-Samen ist die Dauer der Konditionierung. Hierunter versteht man den Zeitraum nach der Trockenlagerung der Samen und vor der Zugabe eines Keimungsstimulans, in dem die Samen in feuchter Umgebung inkubiert werden. Die Inkubation der Samen auf feuchtem Filtrierpapier (steriles H<sub>2</sub>O bidest.) erfolgte in mit Parafilm verschlossenen Petrischalen (Kunststoff) bei RT im Dunkeln. Die Feuchte wurde regelmäßig überprüft und bei Bedarf steriles H<sub>2</sub>O bidest. ergänzt. Zur Ermittlung der optimalen Dauer wurde im Vorversuch der Zeitraum der Konditionierung von 0 bis 35 Tage variiert. Anschließend wurde die Keimung induziert (siehe Kap. 3.3.2.2). In den (meisten) folgenden Versuchen betrug die Konditionierungsdauer acht Tage. Dieser Zeitraum erwies sich in den Vortests als optimal, um im Versuch eine möglichst hohe Keimungsrate bei möglichst kurzer Konditionierungsdauer zu erzielen.

#### 3.3.2.2 Bestimmung der Keimungsrate

Nach der Konditionierung wurde den Petrischalen 20 µl 3 ppm des synthetischen Keimungsstimulans GR 24 zugesetzt, das entsprach einer Konzentration von 0,03 ppm in den Schalen. Die *S. hermonthica*-Samen wurden weiter wie schon zur Konditionierung inkubiert. Nach vier Tagen wurde das Verhältnis von gekeimten Samen zur Samengesamtzahl unter dem Binokular im Durchlicht ermittelt. Es wurden die Samen als gekeimt gezählt, bei denen die Keimwurzel deutlich zur Mikropyle herausgetreten war.

### 3.3.2.3 Keimungsinduktion

#### 3.3.2.3.1 *Keimungsstimulans GR 24*

Die Standardisierung der Keimungstests erfolgte mit dem synthetischen Keimungsstimulans GR 24. Zur Ermittlung der optimalen Konzentration von GR 24 wurden Konzentrationen (in der Petrischale) von  $3 \times 10^{-8}$  bis 3 ppm getestet. Dazu wurde vorab die GR 24-Stammlösung mit sterilem H<sub>2</sub>O bidest. stufenweise entsprechend verdünnt.

#### 3.3.2.3.2 *Anzahl der Samen im Test*

Verschiedentlich (JACKSON und PARKER 1991, LOGAN und STEWART 1991, BABIKER *et al.* 1993) wurde diskutiert, daß *S. hermonthica*-Samen bei ihrer Keimung Ethylen freisetzen würden. Freigesetztes Ethylen könnte seinerseits die Keimung anderer Samen in der Nähe induzieren. Würde nun ein Versuchsansatz mehr Samen enthalten als ein anderer, und lägen die Samen dann dort auch dichter gepackt auf dem Filtrierpapier, so könnte dies eine höhere Gesamtkeimungsrate in dieser Petrischale zur Folge haben. Durch Variation der Samenzahl pro Petrischale wurde in drei Versuchsreihen mit 15, 22 und 24 Tagen Konditionierungsdauer diese Hypothese überprüft.

### 3.3.3 *Haustorialentwicklung*

#### **Induktion durch 2,6-Dimethoxy-p-benzochinon**

2,6-Dimethoxy-p-benzochinon (engl. *2,6-dimethoxy-benzoquinone*, 2,6-DMBQ) wurde in der Literatur als Induktor der Haustorialentwicklung beschrieben (CHANG und LYNN 1986, RIOPEL *et al.* 1986). In Experimenten im Rahmen dieser Arbeit wurde die Keimung von *Striga hermonthica*-Samen mit GR 24 und Sorghum-Wurzelexsudaten in Petrischalen induziert. Den gekeimten *S. hermonthica*-Samen wurde jeweils 1 ml 2,6-DMBQ-Lösung zugesetzt. Verschiedene Konzentration von  $10^{-6}$  bis  $10^{-4}$  M wurden getestet. Die Petrischalen wurden weiter wie schon zur Keimungsinduktion inkubiert. Über einen Zeitraum von zwei Wochen wurden die Keimwurzeln regelmäßig unter dem Lichtmikroskop auf morphologische Veränderungen untersucht. Die Tests erfolgten mit *S. hermonthica*-Samen der Herkunft Mali 95 (M/95) und Kenia 94 (K/94). Es wurden drei Wiederholungen mit jeweils mind. vier Parallelen durchgeführt.

### 3.3.4 *Anzucht von Striga hermonthica in verschiedenen Systemen*

#### 3.3.4.1 Anzucht auf Wirtspflanzen im Gewächshaus

Im Gewächshaus schwankten die Klimabedingungen je nach Jahreszeit bei einer Temperatur zwischen 18 und 28 °C (laut Thermographen). Es erfolgte eine künstliche Beleuchtung über 9 h mit 20.000–30.000 Lux zusätzlich zum Tageslicht. Die Töpfe wurden regelmäßig von oben gewässert.

##### 3.3.4.1.1 *Anzucht der Wirte Sorghum bicolor und Pearl-Millet (Pennisetum glaucum)*

Sorghum- und Millet-Pflanzen wurden auf dem Kultursubstrat Einheitserde Typ ED 73 angezogen. Zum Pikieren wurden drei–vier Wochen alte Pflanzen der Erde entnommen, die Wurzeln vorsichtig von Erde befreit und mit H<sub>2</sub>O bidest. abgespült.

##### 3.3.4.1.2 *Anzucht auf den Wirten Sorghum und Millet im Topfversuch*

Ziel war es, möglichst viele *Striga hermonthica*-Pflanzen für weitere Untersuchungen zu erhalten. Deshalb wurde untersucht, mit welchem Anzuchtverfahren die größte Zahl an *S. hermonthica*-Pflanzen auf den Sorghum-Wirtspflanzen wuchsen. Jeweils eine Spatelspitze *S. hermonthica*-Samen, das entspricht ca. 3000–4000 Samen, wurde den Töpfen nach verschiedenen Methoden zugegeben:

- a) Während des Eintopfens der einzelnen Wirtspflanze wurden *S. hermonthica*-Samen direkt auf die Wurzeln aufgestreut,
- b) wie a) – zusätzlich waren die *S. hermonthica*-Samen vorher oberflächensterilisiert worden,
- c) wie a) – zusätzlich waren die *S. hermonthica*-Samen vorher oberflächensterilisiert und acht Tage konditioniert worden.

Für diese Untersuchung wurden Sorghum-Pflanzen der suszeptiblen Varietät CSM-209 und *S. hermonthica*-Samen der Herkünfte Mali 95 (M/95) und Kenia 94 (K/94) verwendet. In weiteren Anzuchtversuchen wurden *Striga*-Samen auch auf die Erdoberfläche von Töpfen mit Sorghum- und Milletpflanzen aufgestreut und anschließend mit dem Gießwasser ins Erdreich eingespült.

#### 3.3.4.2 Cokulturen *Striga hermonthica* – *Sorghum bicolor* in Petrischalen

Samen der Sorghum-Varietäten N-13, 555, Framida, IS-9830, Seredo, E-36-1, M-35-1, DS-1195, IS-1037, CSM-209 und CSM-335 wurden oberflächensterilisiert und in Petrischalen *in vitro* gekeimt. *S. hermonthica*-Samen aus Mali 95 (M/95) und Kenia 94 (K/94) wurden oberflächensterilisiert und acht Tage konditioniert. Die *Striga*-Samen wurden in mit feuchtem Filtrierpapier (Cellulose, Sorte 595) ausgelegte Petrischalen ( $\varnothing = 145$  mm) überführt. Zur Anfeuchtung wurde steriles H<sub>2</sub>O bidest. verwendet. Sorghum-Pflänzchen mit einer Sproßlänge größer 3 cm wurden so in die großen Petrischalen gelegt, daß die Wurzeln sich über die gesamte Bodenfläche der Petrischale ausbreiten konnten. Der wachsende Sorghum-Sproß gelangte über eine kleine Öffnung in der Petrischale nach außen. Die Schalen wurden mit Parafilm verschlossen, die Öffnung mit dem Sproß bestmöglichst abgedichtet. Anschließend wurden die Schalen (Wurzelraum) mit Alufolie abgedunkelt. Die Kulturen wurden dann in Wachstumsschränken bei T = 28 °C und 16 h Licht (Leuchtstoffröhren) inkubiert. Das Filtrierpapier wurde durch Zugabe von sterilem H<sub>2</sub>O bidest. immer feucht gehalten. In weiteren Versuchen wurde das Filtrierpapier durch Glasfaserfilter GF6 ersetzt. Darüber hinaus wurden Versuche ganz ohne Filtrierpapier oder Glasfaserfilter durchgeführt, stattdessen wurden die Wurzeln und Samen in 1%igem Wasseragar eingebettet. Die Beobachtung der Entwicklungsvorgänge in den Petrischalen erfolgte nach Abnahme der Alufolie unter dem Binokular.

#### 3.3.4.3 In vitro-Kulturen

##### 3.3.4.3.1 Gewebekulturen aus Achselknospen

Die Oberflächensterilisation wurde unter sterilen Verhältnissen in einer Reinraumwerkbank durchgeführt. Es wurden *Striga hermonthica*-Pflanzen aus dem Gewächshaus verwendet. Die Sproßachse der Pflanzen wurde in kleine Abschnitte zerteilt, die jeweils ein Nodium besaßen. Aus der kreuzgegenständigen (dekussierten) Blattstellung von *S. hermonthica* ergibt sich so je Nodium ein Paar potentiell regenerationsfähiger Achselknospen. Diese Abschnitte wurden oberflächensterilisiert: In einem Plastikröhrchen wurden die Gewebestücke mit 20 ml sterilem H<sub>2</sub>O bidest. plus zwei Tropfen Detergens Tween 20 gewaschen. Anschließend wurden sie für zwei Sekunden in 20 ml 70%igem Ethanol, danach 20 min in 20 ml 2,5 % NaOCl, versetzt mit zwei Tropfen Tween 20, geschüttelt. Abschließend wurden die Gewebestücke dreimal mit je 20 ml sterilem H<sub>2</sub>O bidest. gewaschen. Die durch diese Behandlung weiß gebleichten Enden wurden entfernt und die Abschnitte so zugeschnitten, daß ca. 3 mm Sproß oberhalb

und 5 mm unterhalb der Achselknospen erhalten blieb. Zur Regeneration wurden die Sproßabschnitte bis zur Unterseite der Achselknospen in MS-Festmedium in Petrischalen gesteckt und die Schalen mit Parafilm verschlossen. Verschiedene Zusätze zum MS-Medium wurden in Kombination getestet: Gibberellinsäure (GA<sub>3</sub>) 0 bis 3 ppm und Indoleessigsäure (IES) 0 bis 0,1 ppm. Sproßabschnitte, die Regenerationsvermögen zeigten, wurden später auf reines MS-Festmedium in größere Kulturgefäße umgesetzt. Die Kultivierung erfolgte in Wachstumsschränken bei T = 28 °C und 16 h Licht (Leuchtstoffröhren).

#### 3.3.4.3.2 *In vitro*-Kulturen aus Samen

Samen von *Striga hermonthica* wurden wie beschrieben oberflächensterilisiert (Kap. 3.3.1). Danach wurden sie auf MS-Festmedium mit verschiedenen Zusätzen in Petrischalen überführt. Folgende Zusätze wurden getestet, ob sie die Keimung von *S. hermonthica* auslösen und das Wachstum fördern können:

- a) Zeatin-ribosid, 0,5 ppm,
- b) Zeatin-ribosid, 1,0 ppm,
- c) GA<sub>3</sub>, 1 ppm,
- d) GR 24, 3 ppm

sowie Cokulturen mit

- e) Wurzelteilen von Süßkartoffel (*Ipomoea batatas*) und
- f) *Sorghum bicolor* (ganze Pflanzen, die Wurzeln jeweils in MS-Festmedium).

*Striga*-Keimlinge, die Wurzel- und Sproßentwicklung zeigten, wurden später zuerst auf MS-Festmedium mit 0,5 ppm Zeatin-ribosid oder gleich auf MS-Festmedium (ohne Zusatz) umgesetzt. Für bessere Wachstumsbedingungen wurden teilweise auch Plastikröhrchen mit Schrägagar verwendet. Keimungsinduktion und Wachstum fanden in Wachstumsschränken bei T = 28 °C und 16 h Licht (Leuchtstoffröhren) statt.

#### 3.3.4.3.3 *Erhaltung der In vitro*-Kulturen

*S. hermonthica*-Pflanzen in *In vitro*-Kultur wurden alle vier Wochen umgesetzt. Bei Kulturen, die aus einem einzelnen Klon stammten, wurden einzelne Pflanzen ausgewählt, die dann weitervermehrt wurden. Zur Vermehrung wurden unter sterilen Bedingungen die Pflanzensprosse in kleine Abschnitte mit jeweils einem Paar Achselknospen zerteilt und auf frisches MS-Festmedium überführt.

#### 3.3.4.3.4 Untersuchung von ins Nährmedium abgegebenen Stoffen

*S. hermonthica*-Pflanzen in *In vitro*-Kultur gaben während des Wachstums farbige Stoffe in das Nährmedium ab. Mit verschiedenen Lösungsmitteln wurde versucht, diese farbige(n) Substanz(en) aus der Gelmatrix heraus zu isolieren: Aceton, Diethylether, Ethanol, Ethylacetat, H<sub>2</sub>O bidest., Methanol und Toluol. Desweiteren wurde untersucht, ob eine Veränderung des pH-Werts durch die Zugabe von Säure (1 N HCl, Eisessig) oder Alkali (1 bzw. 10 N NaOH) zu einer Farbveränderung führt.

### 3.3.5 Morphologische Charakterisierung von *Striga hermonthica*

#### 3.3.5.1 Samen

Die Samenschalen wurden zunächst unter dem Lichtmikroskop, später auch unter dem Rasterelektronenmikroskop (REM) auf ihre morphologischen Charakteristika hin untersucht. Die maximale Vergrößerung für die Untersuchung der Samenschalen wurde unter dem REM erreicht, sie lag bei 5000fach. Für die Untersuchungen unter dem REM wurden die *S. hermonthica*-Samen mithilfe eines Haares auf spezielle Objektträger aufgebracht. In einem Sputter wurde dann eine Gold-Palladium-Legierung von ca. 20 nm Dicke auf die Samen aufgedampft. Im REM wurden zur Untersuchung folgende Druckwerte eingestellt: Kathode:  $\approx 5,3 \times 10^{-7}$  hPa, Probe:  $\approx 2,7 \times 10^{-6}$  hPa.

#### 3.3.5.2 Blüten

*S. hermonthica*-Pflanzen aus Samen der Herkünfte Mali 95 (M/95) und Kenia 94 (K/94) wurden auf *Sorghum bicolor* im Gewächshaus angezogen. In Zusammenarbeit mit Prof. E. Teryokhin, St. Petersburg, Rußland wurden Pflanzen aus beiden Herkunftsgebieten auf ihre morphologischen Merkmale hin untersucht. Zur Charakterisierung wurden Blütenmerkmale herangezogen: Aufbau, Länge, Struktur und Farbe von Krone (Corolla) und Kelch (Calyx).

### 3.4 Molekularbiologische Methoden – Genetische Variabilität von *Striga hermonthica*

Es wurde die Gesamt-DNA aus Blättern von *Striga hermonthica*-Pflanzen neunzehn verschiedener Herkünfte isoliert. Ein genetischer Fingerabdruck wurde mithilfe der RFLP-Analyse und der RAPD-PCR erstellt. Die Daten der RAPD-PCR-Untersuchungen wurden



anschließend phylogenetisch ausgewertet.

### **3.4.1 Isolierung von Gesamt-DNA aus Gewächshaus- und In vitro-Pflanzen**

Gesamt-DNA von *S. hermonthica* wurde nach der von GEBHARDT *et al.* (1989) modifizierten CTAB-Methode von SAGHAI-MAROOF *et al.* (1989) isoliert. 0,2–0,3 g Blattmaterial wurden im Mörser mit 1 ml CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)-Isolierungspuffer homogenisiert und anschließend in einem Reaktionsgefäß (RG) 1 h bei  $T = 55\text{--}60\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml Dichlormethan wurden die Proben gut durchmischt. Die anschließende 15minütige Zentrifugation erfolgte bei  $14.000 \times g$  in einer Tischzentrifuge. Der wäßrige Überstand wurde abgenommen und mit 1 ml 2-Propanol gemischt. Nach 10maligem Invertieren wurde die ausgefallene DNA mit einer Pasteurpipette in 100%igen Ethanol überführt und dann bei  $T = -20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur weiteren Bearbeitung wurden die DNA-Proben 5 min bei  $14.000 \times g$  in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der 100%ige Ethanol wurde verworfen und stattdessen 70%iger Ethanol zum Waschen auf den DNA-Niederschlag gegeben. Danach wurde wieder für 5 min bei  $14.000 \times g$  in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der 70%ige Ethanol wurde verworfen und der DNA-Niederschlag 30 min im laminaren Luftstrom der Sterilbank getrocknet. Nach Zugabe von 40  $\mu\text{l}$  TE-Puffer wurde die DNA zwei bis drei Stunden im Wasserbad bei  $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelöst. Grobe Inhaltsstoffe wurden mittels Zentrifugation (5 min bei  $14.000 \times g$  in einer Tischzentrifuge) sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues RG überführt. Die DNA in TE-Puffer wurde bis zur weiteren Analyse bei  $T = -20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **3.4.2 Bestimmung der DNA-Konzentration und Reinheit**

Die DNA-Proben wurden 5 min bei  $14.000 \times g$  in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, um Schwebeteilchen zu sedimentieren. Anschließend wurde die Konzentration an Gesamt-DNA photometrisch bestimmt. Dazu wurden die Extinktionen bei  $\lambda = 260\text{ nm}$  und  $280\text{ nm}$  gemessen. Die DNA-Konzentration läßt sich wie folgt berechnen (SAMBROOK *et al.* 1989):

$$[\text{DNA}] \mu\text{g/ml} = E_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Im Versuch wurde eine 1:125 Verdünnung (4  $\mu\text{l}$  Probe und 496  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  bidest.) verwendet.

Die Reinheit der Probe ergibt sich aus dem Quotienten  $E_{260} / E_{280}$ : Reine DNA-Proben besitzen einen Quotienten von 1,8–2,0. Niedrigere Werte deuten auf eine Kontamination mit

Proteinen oder Phenolen hin, Werte größer als 2,0 dagegen auf ein hohes RNA/DNA-Verhältnis.

### **3.4.3 RFLP-Analysen**

#### **3.4.3.1 Restriktionsverdau**

Zum Restriktionsverdau wurden die folgenden Enzyme eingesetzt: BamHI, DraI, EcoRI, EcoRV, HindIII, KpnI und PstI. Im Verdau wurden jeweils 20 µg Gesamt-DNA mit 10 U des jeweiligen Restriktionsenzym umgesetzt. Außerdem befanden sich im Reaktionsansatz 3 µl 10 × Restriktionsverdau-Puffer und 3 µl 10 mg/ml Spermidin. Mit sterilem H<sub>2</sub>O bidest. wurde auf das Endvolumen von 30 µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei T = 37 °C im Wärmeschrank.

#### **3.4.3.2 DNA-Gelelektrophorese**

Die DNA-Fragmente wurden im 0,9%igen Agarosegel aufgetrennt. Das Agarosegel wurde mit 1 × NEB-Puffer hergestellt, der ebenfalls als Laufpuffer Verwendung fand. Darüber hinaus enthielt das Gel 0,0003 % (v/v) Ethidiumbromid. Jeweils 30 µl DNA-Probe und 5 µl Elektrophorese-Probenpuffer wurden vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Trennung erfolgte bei einer angelegten Spannung von 50 V und einer Stromstärke von ca. 100 mA. Die Laufzeit betrug etwa 20 h. Als Längenstandard wurde der DIG-markierte DNA-Molekulargewichtsmarker II (HindIII-geschnittene λ-DNA) eingesetzt. Die Vollständigkeit des Verdau, d. h. ob die gesamte hochmolekulare DNA durch den Restriktionsverdau in kleinere Fragmente gespalten worden war, wurde unter UV-Licht auf dem Transilluminator (Ethidiumbromid-Färbung der DNA-Banden bei  $\lambda = 312 \text{ nm}$ ) überprüft.

#### **3.4.3.3 Southern-Transfer (Southern-Blot)**

Das Agarosegel wurde 10 min in 0,25 N HCl unter leichtem Schwenken inkubiert. Hierbei wurde die aufgetrennte DNA teilweise depuriniert. Anschließend wurde das Gel kurz mit VE-Wasser abgespült und dann 40 min in Denaturierungslösung unter leichtem Schwenken inkubiert. Neben der Trennung in Einzelstränge führte die Natronlauge zur Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen an den Stellen der Depurinierung und damit zu Strangbrüchen. Dies ermöglichte den späteren Transfer der DNA-Fragmente auf die Membran, der mit den

ungeteilten DNA-Strängen nicht möglich gewesen wäre. Das Gel wurde erneut mit VE-Wasser kurz abgespült und dann 40 min in Neutralisierungslösung unter leichtem Schwenken inkubiert. Über Nacht wurden die DNA-Stränge mit  $20 \times$  SSC-Puffer auf eine Nylonmembran übertragen. Dazu wurden zwei Lagen Filtrierpapier so auf eine erhöhte Glasplatte gelegt, daß die Enden jeweils in  $20 \times$  SSC-Puffer tauchten. Das Gel wurde mit der Oberseite nach unten auf das Filtrierpapier gelegt. Auf das Gel wurde die Nylonmembran gelegt, die zuvor 2 min in  $H_2O$  bidest. vorgequollen worden war. Darauf wurden zwei Lagen mit Transferlösung getränkte Filtrierpapiere gelegt, auf diese wiederum zwei trockene Lagen. Es folgte ein ca. 10 cm hoher Stapel aus trockenen Papierhandtüchern, gefolgt von einer Glasplatte. Die Glasplatte wurde mit einem 800 g schweren Gewicht (hier Wanne mit 800 ml Wasser) beschwert. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran kurz (ein- bis zweimal) in  $2 \times$  SSC-Puffer geschwenkt und dann bei RT getrocknet.

#### 3.4.3.4 Fixierung der DNA auf der Membran

Zur Fixierung der DNA auf der Nylonmembran wurde die mit der DNA beladene Seite der Membran 1 min mit UV-Licht ( $\lambda = 312$  nm) auf dem Transilluminator bestrahlt.

#### 3.4.3.5 DIG-nichtradioaktives System zur Nukleinsäure-Markierung und -Detektion

Die Detektion der Banden erfolgte mit dem nichtradioaktiven Digoxigenin (DIG)-System (VAN MILTENBURG *et al.* 1995). Zur Hybridisierung wurden DIG-markierte Sonden eingesetzt. Die Markierung bestand aus in die Sonden eingebautem DIG-gekoppeltem dUTP (Desoxyuridintriphosphat) (Abb. 3-2).

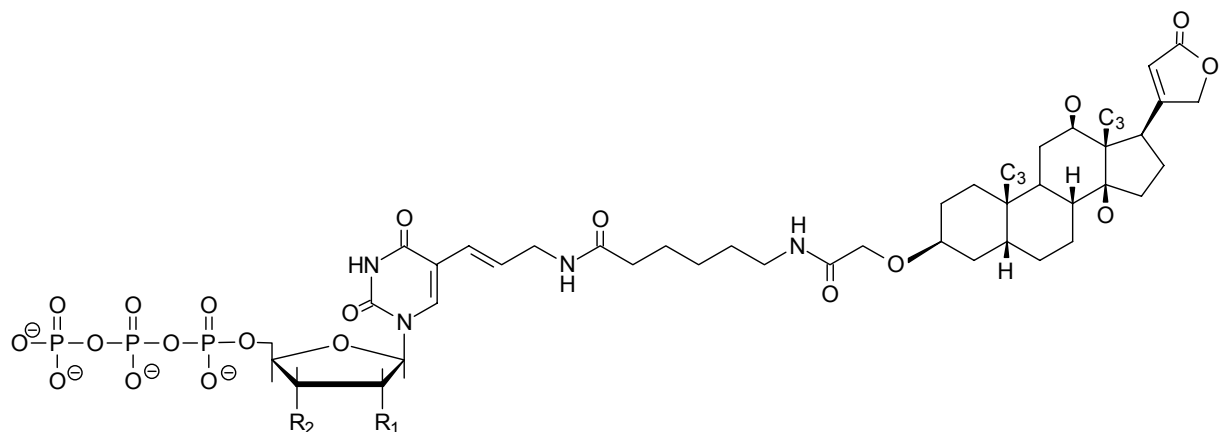


Abb. 3-2: Struktur DIG-markierter Nukleotide – als Beispiel alkali-stabiles dUTP ( $R_1 = H$ ,  $R_2 = OH$ ).

Das Blockierungsreagens in der Prähybridisierungslösung diente dazu, freie Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen und so den Hintergrund zu minimieren. An die hybridisierten Sonden wurde ein Anti-DIG-Antikörper gebunden, der fest an eine alkalische Phosphatase gekoppelt war. Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz-Verfahren. Dabei spaltete die alkalische Phosphatase ein Chemilumineszenz-alkalische Phosphatase-Substrat an den jeweiligen Bindungsorten der Sonden auf der Membran. Die Lumineszenzsignale wurden mithilfe eines Röntgenfilms detektiert.

#### 3.4.3.5.1 Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Sonden

##### **Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden**

Hochrepetitive DNA-Abschnitte sind typisch für das Genom von Eukaryonten. WEISING *et al.* (1989a) und WEISING *et al.* (1989b) zeigten das Vorhandensein von (GATA)<sub>n</sub>- und (GACA)<sub>n</sub>-Wiederholungen in pflanzlichen Genomen der Gymnospermen und Angiospermen. Später konnten solche Abschnitte auch bei den Farnen nachgewiesen werden. Diese repetitiven DNA-Bereiche werden als SSR (engl. *Simple Sequence Repeats*, einfache Sequenzwiederholungen) oder Mikrosatelliten bezeichnet. Zum Nachweis der Bereiche dienen Oligonukleotidsonden. In dieser Arbeit fanden die DIG-markierten Oligonukleotide (GATA)<sub>4</sub>, (GACA)<sub>4</sub> und (GTG)<sub>5</sub> als Sonden Anwendung. Alle Schritte wurden in rotierenden Glasröhren im Hybridisierungsofen durchgeführt. Die Membran mit der fixierten DNA wurde 1 h bei RT in 20 ml Lösung 7 (= Blockierungslösung) inkubiert. Danach folgte eine Prähybridisierung für mindestens 1 h in 20 ml Lösung 8. Die Lösung 8 wurde anschließend durch 20 ml Oligonukleotidsonde (0,16 nmol) in Lösung 8 ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht. Die Hybridisierungstemperatur betrug für die Sonden (GATA)<sub>4</sub> und (GACA)<sub>4</sub> jeweils 30 °C, für (GTG)<sub>5</sub> 40 °C. Zur Vermeidung eines zu hohen Hintergrunds wurde die Membran anschließend dreimal 15 min in 20 ml jeweils frischem 6 × SSC-Puffer bei RT gewaschen. Die Lösungen mit den Oligonukleotidsonden konnten vielfach wiederverwendet werden, gelagert wurden sie bei T = -20 °C.

##### **Hybridisierung mit rDNA-Sonden**

Ebenfalls in einer großer Zahl an Wiederholungen liegen die Gene für rRNAs im Genom vor. In pflanzlichen Genomen gibt es Cluster von DNA-Sequenzen für die 5,8 S, 18 S und 25 S rRNAs. Die Zahl der Kopien liegt bei 1.000 bis 50.000 pro Genom (HEMLEBEN *et al.* 1992, TORRES und HEMLEBEN 1991, BORISJUK *et al.* 1994). In dieser Arbeit wurden die DIG-

markierten Sonden pRZ 18 und pRZ 25 verwendet. Beide Sonden enthalten rDNA-Genabschnitte aus Zucchini (*Cucurbita pepo*). Angewandt wurde die Methode nach KREIKE *et al.* (1990) in modifizierter Form. Alle Schritte wurden in rotierenden Glasröhren im Hybridisierungssofen durchgeführt. Die Membran mit der fixierten DNA wurde 1 h bei  $T = 62,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  in 15 ml Prähybridisierungslösung inkubiert. Danach folgte die Hybridisierung mit der in Prähybridisierungslösung gelösten Sonde (400 ng in 10 ml). Die Sondenlösung wurde vor dem Einsatz 10 min gekocht (Auftrennen der Sonden-DNA in Einzelstränge) und dann 5 min im Eisbad geschüttelt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei  $T = 62,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Zur Vermeidung eines zu hohen Hintergrunds wurde die Membran zweimal 5 min und anschließend zweimal 15 min bei  $T = 62,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit jeweils frischen 15 ml Waschlösung gewaschen. Die Lösungen mit den rDNA-Sonden konnten vielfach wiederverwendet werden, gelagert wurden sie bei  $T = -20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.4.3.5.2 Detektion

Die Detektion erfolgte nach dem Chemilumineszenz-Verfahren mit dem Chemilumineszenz-alkalische Phosphatase-Substrat RTU CDP-*Star*<sup>TM</sup>. Die nachfolgenden Schritte wurden alle bei RT durchgeführt. Die Membran wurde 5 min in 20 ml Puffer 1, danach 30 min in 15 ml Puffer 2 inkubiert. Anschließend wurde die Membran 30 min in 10 ml Anti-DIG-Lösung inkubiert, danach 10 min mit 15 ml Puffer 2 gewaschen. Dann wurde die Membran noch dreimal 10 min mit jeweils frischen 20 ml Puffer 1 gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Schließlich erfolgte die Äquilibration durch fünfminütige Inkubation in 20 ml Puffer 3. Nach diesen Arbeitsschritten, die in der Hybridisierungsröhre erfolgten, wurde die Membran aus der Röhre herausgenommen und kurz in Puffer 3 geschwenkt. Anschließend wurde die Membran auf eine Plastikfolie gelegt, 1 ml RTU CDP-*Star*<sup>TM</sup> in Tröpfchen auf die Membran gegeben und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Danach wurde die Plastikfolie übergeschlagen und die Chemilumineszenzlösung durch Ausstreichen vorsichtig verteilt. Es folgte eine fünfminütige Inkubation, dunkel abgedeckt. Die überschüssige Chemilumineszenzlösung wurde mit einem Roller herausgewalzt und die Folie mithilfe eines Folienschweißgeräts rundum verschlossen. Die Folie wurde außen mit 70%igem Ethanol abgewischt und in einer lichtdicht schließenden Filmkassette so fixiert, daß die Seite der Membran, auf der die DNA fixiert worden war, nach oben zeigte. Anschließend wurde im Dunkeln ein Röntgenfilm aufgelegt, und der Film 30–150 min exponiert. Die Entwicklung erfolgte in einem automatischen Filmentwickler oder manuell in der Dunkelkammer. Für die Weiterverwendung in einem neuen Hybridisierungsexperiment wurde die Membran

zusammen mit 10 ml 2 × SSC-Puffer in Plastikfolie eingeschweißt und bei T = 4 °C gelagert (Membran immer benetzt).

#### 3.4.3.5.3 *Strippen von Membranen*

Zur erneuten Hybridisierung mit einer anderen Sonde kann die gebundene Sonde von der Membran entfernt werden, dieses Verfahren bezeichnet man als „Strippen“. In der Regel konnte eine Membran mindestens viermal „gestrippt“ werden. Alle Arbeitsschritte wurden in rotierenden Glasröhren im Hybridisierungssofen durchgeführt. Die Membran wurde zweimal 15 min bei T = 62,5 °C in Waschlösung A, zweimal 5 min bei T = 62,5 °C in Waschlösung B und zweimal 15 min bei T = 37 °C in Waschlösung C inkubiert. Es wurden jeweils 20 ml frische Waschlösungen verwendet. Zum Schluß wurde die Membran kurz in 2 × SSC-Puffer geschwenkt. Das weitere Vorgehen für die neue Hybridisierung erfolgte wie im Kap. 3.4.3.5.1 beschrieben.

### 3.4.4 **RAPD-PCR**

#### 3.4.4.1 RNase-Verdau

Zur Entfernung von RNA-Anteilen, die die anschließenden RAPD-PCR-Analysen gestört hätten, wurden die *S. hermonthica*-DNA-Proben zuvor mit RNase A verdaut. Die RNase A wurde 15 min im Wasserbad gekocht, um vorhandene DNasen zu inaktivieren. Im RG wurden 50 µl in TE-Puffer gelöster Gesamt-DNA mit 0,5 µl 10 mg/ml RNase A für 1 h bei T = 37 °C verdaut. Anschließend wurde 5 min bei 14.000 × g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Nach Zugabe von 150 µl 2-Propanol wurde viermal invertiert, und die ausgefallene DNA wurde mit einer Pasteurpipette in 150 µl 100%igen Ethanol überführt. Es wurde erneut 5 min bei 14.000 × g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand verworfen und 150 µl 70%iger Ethanol zugegeben. Nach weiteren 5 min Zentrifugation bei 14.000 × g wurde der Überstand verworfen und der DNA-Niederschlag im laminaren Luftstrom der Sterilbank getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 40 µl TE-Puffer für 2–3 h im Wasserbad bei T = 60 °C gelöst. Die Menge an Gesamt-DNA wurde photometrisch bestimmt (siehe Kap. 3.4.2). Die DNA in TE-Puffer wurde bis zur weiteren Analyse bei T = -20 °C gelagert.

### 3.4.4.2 PCR-Ablauf

Die lyophilisierten 10mer-Primer für die RAPD-PCR wurden in sterilem H<sub>2</sub>O bidest. so resuspendiert, daß eine Konzentration von 10 µM erhalten wurde. Das Gesamtvolumen eines PCR-Ansatzes betrug 50 µl. Zuerst wurde ein Mastermix mit allen Komponenten außer der Gesamt-DNA hergestellt. Jeder Probe wurden vor dem Reaktionsstart zu den vorgelegten 46 µl Mastermix 4 µl 20 ng/µl der jeweiligen Gesamt-DNA aus dem RNase-Verdau zugefügt (Tab. 3-1).

Tab. 3-1: Komponenten eines PCR-Ansatzes.

| PCR-Ansatz                                     |               |
|------------------------------------------------|---------------|
| Maßstab/Volumen                                | 50 µl         |
| Mastermix mit allen Komponenten außer DNA      |               |
| Taq-Polymerase                                 | 1 U           |
| PCR-Puffer                                     | 1×            |
| MgCl <sub>2</sub>                              | 2 mM          |
| Nukleotid-Mix                                  | 0,2 mM        |
| Primer (gleicher Primer für beide DNA-Stränge) | 0,4 µM        |
| DMSO                                           | 5 %           |
| H <sub>2</sub> O bidest., steril               | ad 46 µl      |
| Gesamt-DNA in TE-Puffer                        | 80 ng in 4 µl |

Die Amplifikation wurde in einem PCR-Thermocycler mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt (Abb. 3-3):

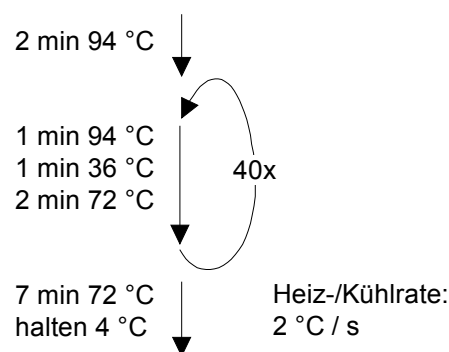


Abb. 3-3: PCR-Temperaturprofil.

Die siebenminütige Inkubation bei T = 72 °C diente der vollständigen Kettenverlängerung. Bis zur Entnahme aus dem PCR-Thermocycler wurden die Proben bei T = 4 °C gehalten.

#### 3.4.4.3 Auftrennen der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden im 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Das Agarosegel wurde mit  $1 \times$  NEB-Puffer hergestellt, der ebenfalls als Laufpuffer Verwendung fand. Das Gel enthielt außerdem 0,0005 % (v/v) Ethidiumbromid zur späteren Sichtbarmachung der Banden unter UV-Licht. Jeweils 10  $\mu$ l PCR-Produkt und 1  $\mu$ l Elektrophorese-Probenpuffer wurden vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Trennung erfolgte bei einer angelegten Spannung von 50 V und einer Stromstärke von ca. 130 mA. Die Laufzeit betrug durchschnittlich 3 h. Als Längenstandards wurden die DNA-Molekulargewichtsmarker VIII und XVI eingesetzt.

#### 3.4.4.4 Detektion und Bandenbestimmung

Die aufgetrennten PCR-Produkte im Agarosegel wurden auf dem Transilluminator unter UV-Licht ( $\lambda = 312$  nm) sichtbar gemacht. Aufnahmen der Bandenmuster wurden mittels Videodokumentationssystem angefertigt. Als erstes wurde untersucht, mit welchen Primern Amplifikationsprodukte, d. h. Banden, erhalten werden konnten. Banden, die deutlich und reproduzierbar auftraten und zumindest für die Mehrzahl der Genotypen einer Herkunft vorhanden waren, wurden ausgewählt. In allen PCR-Läufen wurde überprüft, ob die ausgewählten Banden für die jeweilige Primer-Genotyp-Kombination vorhanden waren oder nicht. Die aus allen PCR-Läufen erhaltenen Bandenmuster wurden in einer Tabelle zusammengefaßt. Vorhandene Banden wurden mit „1“ registriert, nicht vorhandene erhielten eine „0“. Primer-Genotyp-Kombinationen, für die selbst nach mehrmaligen Wiederholungsversuchen keine eindeutigen Daten erhalten werden konnten, wurden in der Tabelle mit „.“ vermerkt.

#### 3.4.5 *Phylogenetische Auswertung*

Die gewonnene Datenmatrix wurde mit den Computerprogrammen *PAUP\** und *Popgene* analysiert. Zur phylogenetischen Auswertung aller RAPD-PCR-Einzeldaten wurden mit dem Programm *PAUP\** zwei Dendrogramme mit unterschiedlichen Algorithmen erstellt. Das eine Dendrogramm wurde unter Verwendung des Verfahrens nach *UPGMA* (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*) erstellt. Der erhaltene Baum wurde mittels heuristischem *Bootstrap*-Verfahren auf seine Güte hin überprüft. Dazu wurde eine 50%ige Konsensusbedingung eingestellt, und es wurden 100 Wiederholungen gerechnet. Das andere



Dendrogramm wurde mit der Methode *Maximum Parsimony* (MP) erstellt. Aus 2000 berechneten Bäumen wurde ein 50 %-Konsensusbaum ermittelt. Für die Untersuchung der RAPD-Daten auf Populationsebene mit dem Programm *Popgene* wurden die DNA-Proben gleicher Herkunft zu einer Population zusammengefaßt. Die einzelne Kenia-Probe K/K/96/iv aus *In vitro*-Aufzucht wurde den Proben aus Gewächshaus-Aufzucht K/K/96 zugeordnet. Als Maß für die genetische Variabilität innerhalb der Populationen wurde die Gendiversität  $h$  nach NEI (1973) bestimmt. Zur Ermittlung der genetischen Identität und der genetischen Distanz (GD) wurde die Methode ohne zusätzliche Randbedingungen (engl. *unbiased*) nach NEI (1978) angewandt. Ein Dendrogramm wurde aufgrund der ermittelten GDs mit dem UPGMA-Verfahren erstellt. *Popgene* verwendet hierfür eine Modifikation der Prozedur *Neighbor* aus dem Programm *Phylip Version 3.5c*<sup>7</sup>.

### **3.5 Interaktion Wirt – Parasit *Striga hermonthica*. Identifizierung keimungs-induzierender Stoffe in Sorghum- und Millet-Wurzelexsudaten**

Samen von *Striga hermonthica* benötigen zur Keimung einen chemischen Stimulus. Stoffe, die als Keimungsstimulans wirken können, werden von verschiedenen Wirtspflanzen und Nicht-Wirtspflanzen (*Falsche-Wirte*) über die Wurzel in die Umgebung abgegeben. Sorghum- und Millet-Varietäten wurden auf ihre Kompetenz zur Abgabe solcher Stoffe getestet. Als „Bioindikatoren“ wurden bei allen Untersuchungen *S. hermonthica*-Samen der Herkunft Mali 95 (M/95) in Keimungstests eingesetzt. Stichproben mit Samen der Herkunft Kenia 94 (K/94) zeigten kein von dem der Samen aus Mali 95 abweichendes Keimungsverhalten.

#### **3.5.1 Gewinnung von Wirtswurzelexsudaten**

Wurzelexsudate der *Sorghum bicolor*-Varietäten N-13, 555, Framida, IS-9830, Seredo, E-36-1, M-35-1, DS-1195, IS-1037, CSM-209 und CSM-335 sowie der Millet-Varietäten Soxsat und Boboni wurden gesammelt. Hierzu wurden Keimlinge mit ausgeprägter Keimwurzel (rund eine Woche alt, die Pflanzenentwicklung variierte je nach Varietät) verwendet (Anzucht nach Kap. 3.2). Jeweils vier bis fünfzehn Keimlinge wurden in breite Kulturröhrchen mit Verschlusskappen überführt, so daß die Wurzeln in 12 ml steriles H<sub>2</sub>O bidest. am Boden des Kulturröhrchens tauchten. Das Sammeln der Exsudate erfolgte über

---

<sup>7</sup> © 1986–93 by Joseph Felsenstein, Dept. of Genetics SK-50, University of Washington, Seattle, WA, USA.

einen Zeitraum von ein bis zwei Wochen in Wachstumsschränken bei  $T = 28\text{ °C}$  und 16 h Licht (Leuchtstoffröhren).

### 3.5.2 Keimungstest mit *Striga hermonthica*-Samen

Für den Test auf keimungsinduzierende Stoffe wurden jeweils 100 µl der Rohexsudate in einen *S. hermonthica*-Keimungstest (Kap. 3.3.2) eingesetzt. Als Kontrollen wurden 0,03 ppm des Keimungsstimulans GR 24 verwendet. Rohexsudate, die die Keimung von *S. hermonthica* induzierten, wurden mit der Dünnschichtchromatographie (DC) weiter untersucht.

### 3.5.3 Konzentrierung keimungsinduzierender Stoffe

Zum Nachweis der keimungsinduzierenden Stoffe in der Bioautographie war eine möglichst hohe Konzentration der Substanzen in den Testlösungen wünschenswert. Zur Erhöhung der Konzentration keimungsinduzierender Stoffe in den Proben wurden zwei Verfahren auf ihre Tauglichkeit überprüft:

— Lyophilisieren:

Wurzelexsudate und GR 24-Testlösungen wurden über Nacht bei  $T = -20\text{ °C}$  oder  $-70\text{ °C}$  eingefroren. Kleinere Volumina in Reaktionsgefäßen wurden in der SpeedVac, größere Probenmengen in einer Gefriertrocknungsanlage über Nacht lyophilisiert. Anschließend wurden die Lyophilisate in  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. resuspendiert. Proben der Wurzelexsudate wurden in einem Zehntel des Ausgangsvolumens aufgenommen. Bei Versuchen mit dem Keimungsstimulans GR 24 wurden die Proben um (rechnerisch) Faktor 1, 10 und 50 angereichert, d. h. für Faktor 1: Das Lyophilisat wurde im Ausgangsvolumen aufgenommen, bei Faktor 10 in einem 10tel, bei Faktor 50 in einem 50stel des Ausgangsvolumens, jeweils in  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. Als Kontrolle für die Keimungstests dienten Proben mit GR 24 ohne spezielle Behandlung.

— Konzentrieren über Trocknungsmittel:

Das Trocknungsmittel Blaugel wurde im Trockenschrank mehrfach 4 h bei  $T = 150\text{ °C}$  getrocknet. Wurzelexsudate und GR 24-Lösungen wurden jeweils in ein Präparateglas gefüllt. Dieses Glas wurde in ein größeres Gefäß gestellt. Blaugel wurde bis knapp unter den Rand des Präparateglases gefüllt und das Außengefäß mit einem Deckel und Parafilm verschlossen. Der Konzentrierungsvorgang dauerte zwei Wochen bei RT im Dunkeln.

Die Proben wurden in Keimungstests mit *S. hermonthica*-Samen der Herkunft Mali 95 (M/95) untersucht.

### 3.5.4 Dünnschichtchromatographie

Die Durchführung erfolgte analog Kap. 3.2.5.4, die DC-Platten wurden allerdings nicht vorchromatographiert. Das Format der DC-Platten (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 0,2 mm Schichtdicke auf Alufolie) betrug 10 cm × 10 cm. Als mobile Phase wurden verschiedene Laufmittel getestet:

- Laufmittel 3: Ethylacetat:Hexan 9:1 (v/v),
- Laufmittel 4: 2-Butanol:Ethanol:H<sub>2</sub>O bidest. 4:4:2 (v/v/v),
- Laufmittel 5: Ethylacetat:Methanol:Hexan 7:2:1 (v/v/v),
- Laufmittel 6: Ethylacetat (100 %).

Auf die DC-Platte wurden bis zu 250 µl der jeweiligen Probe in 5 µl-Schritten tüpfelweise aufgebracht. Für die Untersuchung der Wurzelexsudatproben wurde das Laufmittel 4 verwendet. Dieses zeigte bei den (Vor-) Versuchen mit dem Keimungsstimulans GR 24 das beste Trennvermögen auf der DC-Platte.

#### Detektion von Substanzflecken

Nach der dünnschichtchromatographischen Trennung wurden die DC-Platten visuell bei Tageslicht sowie unter UV-Licht der Wellenlängen  $\lambda = 254$  und 366 nm untersucht. Unter UV-Licht wurde die Eigenfluoreszenz und bei  $\lambda = 254$  nm zusätzlich die Fluoreszenzlöschung des Indikators der stationären Phase beobachtet. Außerdem wurden verschiedene Verfahren zur Sichtbarmachung mittels Bedampfung und Farbreagentien getestet (KREBS *et al.* 1967, FREY und ZIELOFF 1993) sowie eine Bioautographie mit *S. hermonthica*-Samen als Bioindikatoren durchgeführt. Die Substanzen wurden anhand ihres R<sub>F</sub>-Werts im Chromatogramm charakterisiert.

#### 3.5.4.1 Bedampfung

Die DC-Platten wurden im Abzug in den Dampfraum über folgenden Flüssigkeiten gebracht:

- Ammoniak: unspez. Reaktion, Redox-Reaktionen (?),
- Brom: unspez. Reaktion,
- Iod: unspez. Reaktion, meist reversible Anlagerung, auch Oxidation und Addition – viele organische Verbindungen erscheinen als braune Flecken.

Anschließend wurde visuell untersucht, ob Substanzen aufgrund einer Farbreaktion auf der

DC-Platte zu detektieren waren.

### 3.5.4.2 Farbreagentien

Die Farbreagentien (Tab. 3-2) wurden als verdünnte Lösung mittels Druckluftzerstäuber auf die DC-Platte aufgesprüht. Der Sprühvorgang wurde in einer Zick-zack-Bewegung im Abzug ausgeführt.

Tab. 3-2: Sprühreagentien für die Identifizierung von Substanzen auf DC-Platten.  
Reagentien mit Ausnahme des Phosphomolybdat-Sprays nach KREBS *et al.* (1967)

| Reagens                                           | nachgewiesene Substanzklassen                                                                                      |
|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (Nr. 15)        | Zucker, Steroide und Terpene                                                                                       |
| Iod-Kaliumiodid-Färbung (Nr. 128 und 129)         | neutral: organische Verbindungen<br>sauer: Alkaloide                                                               |
| Kaliumpermanganat-Schwefelsäure-Reagens (Nr. 145) | universell für organische Verbindungen                                                                             |
| Molybdatophosphorsäure-Reagens (Nr. 158)          | allgemein für reduzierende Substanzen<br>(Alkohole, Gallensäuren, Lipide, Fettsäuren, Steroide)                    |
| Vanillin-Schwefelsäure-Reagens (Nr. 247)          | Kohlenhydrate, Glycole, reduzierte Carbonsäuren, Steroide, Antioxidantien, Vitamine, Phenole und aromatische Amine |
| Phosphomolybdat-Spray (Fa. Merck)                 | wie Molybdatophosphorsäure-Reagens (Nr. 158)                                                                       |

Verfahren zur Sichtbarmachung von Substanzflecken auf DC-Platten unter Verwendung der Farbreagentien nach Tab. 3-2:

— Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagens (Nr. 15)

Sprühlösung, frisch bereitet:

0,5 ml Anisaldehyd in 50 ml Eisessig unter Zusatz von 1 ml Schwefelsäure konz.;

Nachbehandlung: Erhitzen auf 100–105 °C.

— Iod-Kaliumiodid-Färbung (Nr. 128 und 129)

Nr. 128, neutral – Sprühlösung: 0,2 g Iod und 0,4 g Kaliumiodid in 100 ml H<sub>2</sub>O bidest.

Nr. 129, sauer – Sprühlösung: 1 g Iod und 10 g Kaliumiodid in 50 ml H<sub>2</sub>O bidest. unter Erwärmen gelöst und mit 2 ml Eisessig angesäuert, mit H<sub>2</sub>O bidest. ad 100 ml aufgefüllt.

— Kaliumpermanganat-Schwefelsäure-Reagens (Nr. 145)

Sprühlösung: 0,5 g Kaliumpermanganat in 15 ml Schwefelsäure konz.

- Molybdatophosphorsäure-Reagens (Nr. 158)  
Sprühlösung: 10%ige Molybdatophosphorsäurelösung in Ethanol;  
Nachbehandlung: Erhitzen auf 120 °C.
- Vanillin-Schwefelsäure-Reagens (Nr. 247)  
Sprühlösung: 1 g Vanillin in 100 ml Schwefelsäure konz.;  
Nachbehandlung: Erhitzen auf 120 °C.
- Phosphomolybdat Spray (Fa. Merck)  
gebrauchsfertig; Nachbehandlung: Erhitzen auf 120 °C.

Die DC-Platten wurden visuell untersucht, ob eine Farbreaktion mit Substanzen auf der Platte stattgefunden hatte.

#### 3.5.4.3 Bioautographie mit *Striga hermonthica*-Samen

Zum spezifischen und hochsensitiven Nachweis keimungsinduzierender Stoffe wurden vorkonditionierte *Striga hermonthica*-Samen der Herkunft Mali 95 (M/95) (siehe Kap. 3.3) auf DC-Platten (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 0,2 mm Schichtdicke auf Alufolie) aufgebracht. Alle Arbeitsschritte bis zur Inkubation wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um eine Kontamination mit Pilzen oder Bakterien zu vermeiden.

##### 3.5.4.3.1 *Test auf Verbreiterung*

Da die Keimung der Samen nur in feuchter Umgebung möglich war, wurden die DC-Platten mit Wasseragar überschichtet. Es wurde untersucht, ob die Auftragung des Wasseragars und die Feuchte zur Verbreiterung bzw. Wanderung der Keimungsstimulanten auf den DC-Platten führt. Hierzu wurden acht Tage vorkonditionierte *S. hermonthica*-Samen auf eine 8 cm × 10 cm große DC-Platte möglichst gleichmäßig verteilt aufgebracht. In der Mitte der DC-Platte wurden dreimal nacheinander jeweils 5 µl 0,03 ppm Keimungsstimulans GR 24 aufgebracht. Anschließend wurde die Platte dünn mit 0,7%igem Wasseragar überschichtet. Nach einer Woche wurden unter dem Binokular die Positionen der gekeimten Samen ermittelt.

##### 3.5.4.3.2 *Testsystem*

Die DC-Platten wurden nach dem DC-Lauf quer zur Laufrichtung in 1 cm breite Streifen zerschnitten. Auf die Kieselgeloberfläche der DC-Streifen wurden zentral Testfilter mit acht

Tage vorkonditionierten *S. hermonthica*-Samen aufgelegt. Damit die lokale Umgebung feucht blieb, wurde auf die feuchten Testfilter nochmals 50 µl steriles H<sub>2</sub>O bidest. gegeben. Anschließend wurden die Testfilter dann mit 150 µl 0,7%igem Wasseragar überschichtet. Die DC-Streifen mit Testfilter wurden in mit Parafilm verschlossenen Kunststoff-Petrischalen eine Woche bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Testfilter von den DC-Streifen abgenommen. Die Zahl der gekeimten *S. hermonthica*-Samen und die Samengesamtzahl wurden unter dem Binokular im Durchlicht bestimmt.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 *Sorghum bicolor* und Pearl-Millet (*Pennisetum glaucum*)

#### 4.1.1 Bestimmung der Keimungsrate

Die Keimungsraten der kühl (Kühlraum 4 °C) gelagerten Samen verschiedener Varietäten von Sorghum (*Sorghum bicolor*) und Millet (*Pennisetum glaucum*) wurden in Keimungstests ermittelt. Dazu wurden jeweils 10–40 Samen der Varietäten in feuchter Umgebung auf Filtrierpapier in Petrischalen inkubiert. Anschließend wurde die Keimungsrate bestimmt (Tab. 4-1). Die Keimungsraten lagen zwischen 10 und 100 %. Vergleichsweise niedrige Keimungsraten ergaben sich in einzelnen Experimenten für die Sorghum-Varietäten N-13 (Minimum 10 %) und M-35-1 (11 %). Bei vielen Varietäten schwankten die Keimungsraten zwischen den einzelnen Experimente stark.

Tab. 4-1: Keimungsraten der Samen der Sorghum (*Sorghum bicolor*)- und Pearl-Millet (*Pennisetum glaucum*)-Varietäten im Petrischalenversuch. Keimungsraten [%], fünf Experimente mit jeweils 10–40 Samen je Varietät

| Art          | Varietät      | Experiment |     |     |     |     |
|--------------|---------------|------------|-----|-----|-----|-----|
|              |               | 1          | 2   | 3   | 4   | 5   |
| Sorghum      | N-13          | 28         | 30  | 30  | 70  | 10  |
|              | 555           | 50         | 50  | 50  | 70  | 80  |
|              | Framida       | 72         | 90  | 60  | 50  | 90  |
|              | IS-9830       | 61         | 95  | 65  | 100 | 60  |
|              | Seredo        | 33         | 75  | 50  | 70  | 90  |
|              | E-36-1        | 22         | 80  | 50  | 70  | 70  |
|              | M-35-1        | 11         | 50  | 30  | 20  | 70  |
|              | DS-1195       | 72         | 90  | 100 | 60  | 70  |
|              | IS-1037       | 28         | 100 | 30  | 90  | 100 |
|              | CSM-209       | 100        | 95  | 100 | 100 | 100 |
|              | CSM-335       | 94         | 85  | 85  | 80  | 90  |
|              | Toroniou C1   | 90         | 100 | 75  | 40  | 100 |
| Pearl-Millet | Millet 1991/1 | 72         | 75  | 70  | 43  | 80  |
|              | Soxsat        | 94         | 85  | 80  | 40  | 90  |
|              | Boboni        | 100        | 100 | 95  | 90  | 100 |

#### 4.1.2 Bestimmung der Keimfähigkeit von Sorghum-Samen im TTC-Test

Ein Verfahren, das vielfach zur Bestimmung der Keimfähigkeit von Samen angewandt wird, ist der TTC-Test. Hierbei wird das 2,3,5-Triphenyl-tetrazoliumchlorid (TTC) durch in lebensfähigen Samen vorhandene Reduktionsäquivalente und mitochondriale Dehydrogenasen zum roten Formazan reduziert. Der TTC-Test wurde beispielhaft an Samen der Sorghum-Varietät N-13 durchgeführt. Nach der Inkubation in TTC-Lösung zeigten die Samen eine rotgefärbte Schale. Halbierte man die Samen, so war im Querschnitt deutlich der tiefrotgefärbte Embryo zu erkennen. Das Speichergewebe behielt seine weiße Farbe. Die Zahl rotgefärbter Samen (TTC-positiv) wurde bestimmt: In allen drei Experimenten waren alle N-13-Samen, also 100 %, als TTC-positiv einzustufen (Tab. 4-2). Untersuchungen zur Keimfähigkeit von *Striga hermonthica*-Samen sind in Kap. 4.2.1 und 4.2.2 dargestellt.

Tab. 4-2: Anteil der im TTC-Test positiven Samen der Sorghum-Varietät N-13. Drei Experimente mit jeweils 10 Samen

|                 | Experiment |     |     |
|-----------------|------------|-----|-----|
|                 | 1          | 2   | 3   |
| TTC-positiv [%] | 100        | 100 | 100 |

#### 4.1.3 Identifizierung von Exoenzym-beeinflussenden Stoffen

Es wurden Wurzelexsudate von 28 Tage-alten Pflanzen der Sorghum-Varietäten IS-9830, Framida, DS-1195, Seredo, IS-1037 und E-36-1 gewonnen. Das Frischgewicht der hierfür verwendeten Wurzeln der verschiedenen Varietäten wurde bestimmt (Tab. 4-3). Die Versuchspflanzen der verschiedenen Varietäten besaßen einen unterschiedlich großen Wurzelballen mit Wurzelmassen von 99 mg bis 520 mg. In verschiedenen Enzymtestsystemen wurde untersucht, ob die Aktivität der jeweiligen Exoenzyme durch die Zugabe von Wurzelexsudaten der verschiedenen Varietäten positiv (erhöhte Aktivität) oder negativ (verminderte Aktivität) beeinflusst wird. Folgende Enzyme wurden getestet: Endocellulase, Endoxylanase,  $\beta$ -Glucosidase und Polygalacturonase. Diese Exoenzyme werden von Keimwurzeln von *Striga hermonthica* abgegeben und spielen bei der Penetration der Keimwurzel in das Wirtsgewebe möglicherweise eine entscheidende Rolle (BROOKS 1995, BAUMANN 1996, BÄCKER 1997). Bei den im Versuch eingesetzten Enzymen handelte es sich nicht um originäre Enzyme aus *Striga hermonthica*, sondern um kommerziell zu beziehende Enzyme aus anderen Organismen mit gleicher enzymatischer Funktion. Für jedes Enzym wurde vorab die Menge ermittelt, bei der im Vorversuch ohne Exsudate der Umsatz des



Substrats gut zu verfolgen war. Darüber hinaus sollte noch ausreichend Substrat im Testsystem vorliegen, so daß ein höherer Umsatz durch Aktivitätssteigerung aufgrund der Wurzelexsudatzugabe meßbar wäre.

Tab. 4-3: Frischgewichte der zur Exsudatgewinnung verwendeten Wurzeln der verschiedenen *Sorghum bicolor*-Varietäten.

| Sorghum-Varietät | Frischgewicht [g] |
|------------------|-------------------|
| IS-9830          | 0,433             |
| Framida          | 0,468             |
| DS-1195          | 0,520             |
| Seredo           | 0,099             |
| IS-1037          | 0,212             |
| E-36-1           | 0,340             |

#### 4.1.3.1 Endocellulase-Aktivitätstest

Die Zugabe von Sorghum-Wurzelexsudaten aller getesteten Varietäten führte zum Anstieg der Aktivität der Endocellulase (EC 3.2.1.4) gegenüber Kontrollen ohne Wurzelexsudatzusatz. Die gemessenen Enzymaktivitäten betrugen zwischen 107 % und 140 %, bezogen auf die Aktivität der Kontrolle. Die Aktivitätswerte für die Varietät Seredo lagen dabei auffallend niedrig. Dies kann daraus resultieren, daß die zur Exsudatgewinnung eingesetzte Seredo-Pflanze nur eine geringe Wurzelmasse besaß (siehe Tab. 4-3). Die Streubreite zwischen zwei Experimenten war besonders bei den Varietäten IS-1037, Seredo und DS-1195 groß. Im Vergleich der Varietäten untereinander war keine eindeutige Gruppierung der Aktivitätswerte festzustellen (Abb. 4-1).

#### 4.1.3.2 Endoxylanase-Aktivitätstest

Die Zugabe von Sorghum-Wurzelexsudaten aller getesteten Varietäten führte zur Verringerung der Aktivität der Endoxylanase (EC 3.2.1.8) verglichen mit Kontrollen ohne Wurzelexsudatzusatz. Die ermittelten Aktivitätswerte reichten von 55 % (E-36-1) bis 99 % (Seredo). Die Streubreite zwischen den einzelnen Experimenten war besonders bei den suszeptiblen Varietäten E-36-1 und IS-1037 sowie bei den resistenten Varietäten Framida und IS-9830 sehr groß. Im Vergleich der Varietäten untereinander war, auch aufgrund der großen Streuung von Experiment zu Experiment, keine eindeutige Gruppierung der Aktivitätswerte festzustellen (Abb. 4-2).

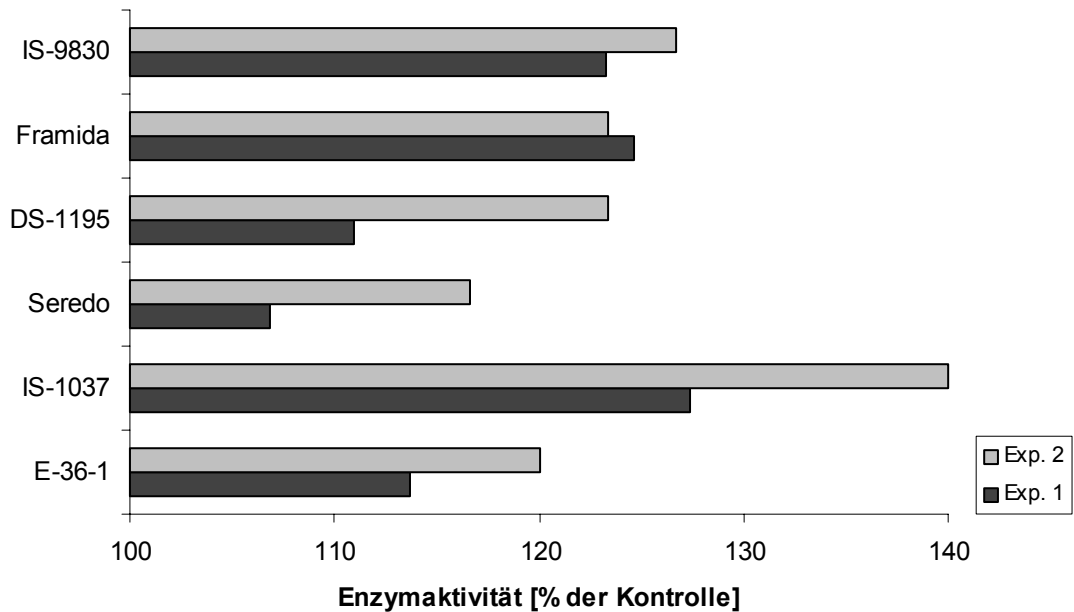


Abb. 4-1: Endocellulase (EC 3.2.1.4)-Aktivität beeinflusst durch Sorghum-Wurzelexsudat. Enzymaktivitäten [% der Kontrolle], die Kontrolle ( $H_2O$  bidest. anstatt Wurzelexsudat) entspricht hundert Prozent, zwei Experimente

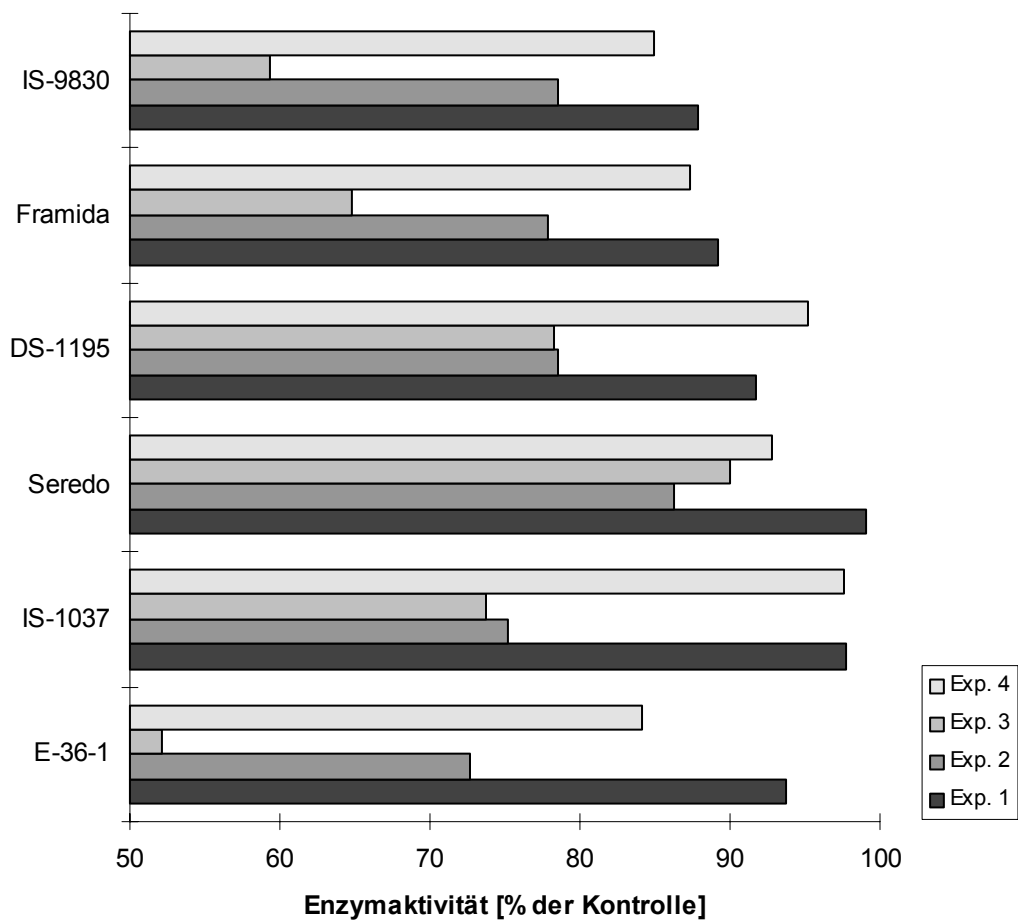


Abb. 4-2: Endoxylanase (EC 3.2.1.8)-Aktivität beeinflusst durch Sorghum-Wurzelexsudat. Enzymaktivitäten [% der Kontrolle], die Kontrolle ( $H_2O$  bidest. anstatt Wurzelexsudat) entspricht hundert Prozent, vier Experimente

#### 4.1.3.3 $\beta$ -Glucosidase-Aktivitätstest

Die Zugabe von Sorghum-Wurzelexsudaten aller getesteten Varietäten führte zur Verringerung der Aktivität der  $\beta$ -Glucosidase (EC 3.2.1.21) verglichen mit Kontrollen ohne Wurzelexsudatzusatz. Der Einfluß der Exsudate auf die Aktivität der  $\beta$ -Glucosidase war aber nur gering: Die Enzymaktivitäten reichten von 91–100 %. Die Streubreite zwischen den einzelnen Experimenten war verglichen mit den anderen Testsystemen geringer. Im Vergleich der Varietäten untereinander war keine eindeutige Gruppierung der Aktivitätswerte festzustellen (Abb. 4-3).

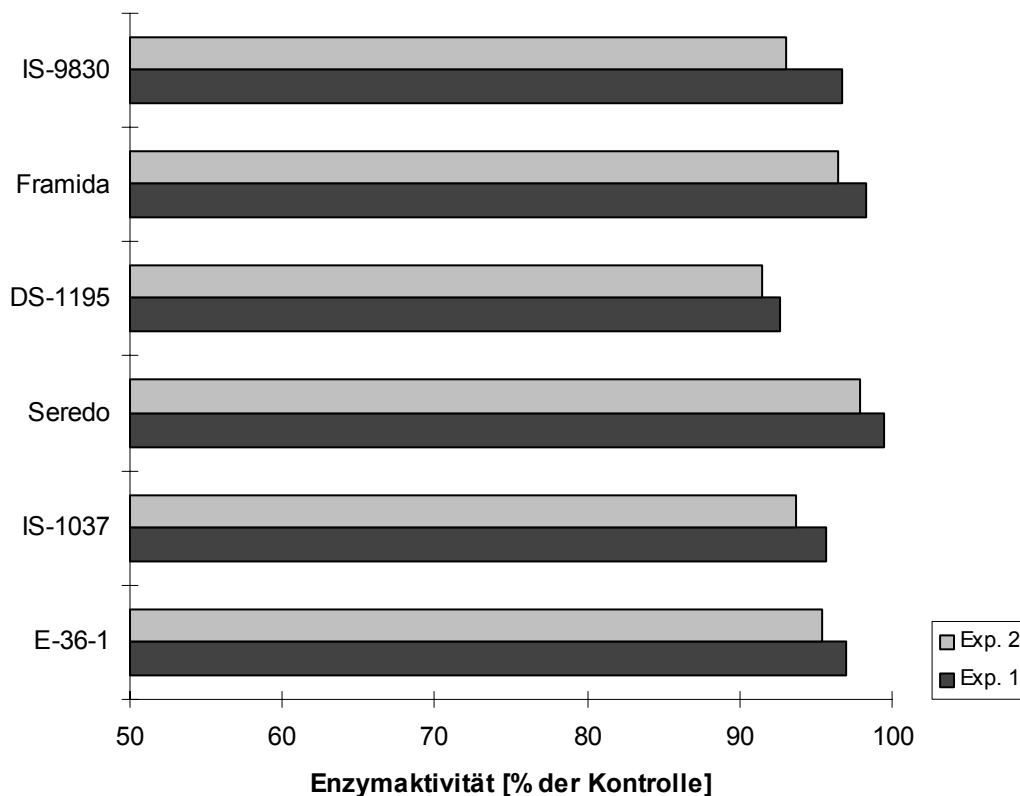


Abb. 4-3:  $\beta$ -Glucosidase (EC 3.2.1.21)-Aktivität beeinflusst durch Sorghum-Wurzelexsudat. Enzymaktivitäten [% der Kontrolle], die Kontrolle ( $H_2O$  bidest. anstatt Wurzelexsudat) entspricht hundert Prozent, zwei Experimente

#### 4.1.3.4 Polygalacturonase-Aktivitätstest

Die Exsudate der Sorghum-Varietäten IS-9830, Framida, DS-1195, IS-1037 und E-36-1 führten zur Steigerung der Aktivität der Polygalacturonase (EC 3.2.1.15) auf Werte von 113–133 %. Exsudat der Varietät Seredo bewirkte dagegen eine Verringerung der Enzymaktivität auf 84 % (Abb. 4-4). Eine weitergehende Überprüfung dieses Ausnahmeverhaltens war nicht möglich, da hierfür nicht ausreichend Wurzelexsudate zur Verfügung standen.

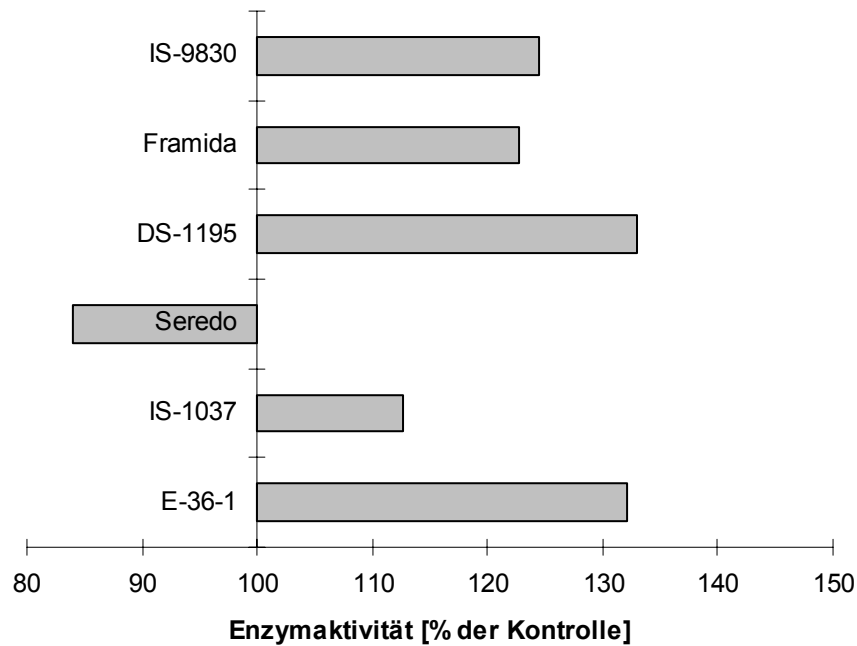


Abb. 4-4: Polygalacturonase (EC 3.2.1.15)-Aktivität beeinflusst durch Sorghum-Wurzelexsudat. Enzymaktivitäten [% der Kontrolle], die Kontrolle ( $H_2O$  bidest. anstatt Wurzelexsudat) entspricht hundert Prozent

#### 4.1.4 Identifizierung von Phytoalexinen aus der Wurzel von *Sorghum bicolor*-Varietäten

Wurzeln verschiedener *Sorghum bicolor*-Varietäten wurden mit Elicitoren der Phytoalexinsynthese in Kontakt gebracht. Hierzu wurden die Wurzeln in einer Suspension entweder mit *Aspergillus niger*-Sporen oder mit Hefezellwandbestandteilen inkubiert. Anschließend wurden Exsudate und Extrakte der Wurzeln hergestellt. Kontrollpflanzen wurden in  $H_2O$  bidest. inkubiert bzw. ohne Inkubation direkt aus dem Gewächshaus entnommen. Die Exsudate und Extrakte wurden mit der Dünnschichtchromatographie (DC) untersucht. Eine Bioautographie mit dem Pilz *Aspergillus niger* als Biotestorganismus wurde zur Identifizierung von Phytoalexinen in den Proben eingesetzt.

##### 4.1.4.1 Dünnschichtchromatographie

Die Extrakte und Exsudate von Sorghum-Wurzeln nach verschiedenen Behandlungen wurden mittels DC untersucht. Tab. 4-4 zeigt als Beispiel die Trennung von Extrakten der resistenten Varietäten 555 und IS-9830. Die DC-Platte wurde bei Tageslicht, unter UV-Licht und zusätzlich nach Ammoniak-Bedampfung untersucht. Im Vergleich der Varietäten wurden für 555 und IS-9830 zwar unterschiedliche Banden gefunden, die Proben von einer Varietät, ob mit Elicitoren inkubiert oder Kontrollen, waren allerdings jeweils identisch.

Tab. 4-4: Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Wurzelextrakten „resistenter“ Sorghum-Varietäten nach unterschiedlicher Behandlung – Bandencharakteristika.

DC-Platte: DC-Alufolie, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Schichtdicke 0,2 mm; vorchromatographiert mit Chloroform:Methanol 1:1 (v/v); mobile Phase: Ethylacetat:Ameisensäure:2N HCl 85:9:6 (v/v/v) (Laufmittel 1); Proben, je 5 µl: *S. bicolor*-Varietäten 555 und IS-9830; Elicitor: Suspension von: /A, *Aspergillus niger*-Sporen; /H, Hefezellwandbestandteilen bzw. /K, Kontrolle (H<sub>2</sub>O bidest.); alle Proben sind Aceton-Lösungen von Extrakten (/E/A)

| Bande<br>R <sub>F</sub> -Wert | Bandenfarbe                      |      | Sorghum-Wurzelprobe |               |               |                      |                      |                      |
|-------------------------------|----------------------------------|------|---------------------|---------------|---------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                               | UV <sub>366</sub>                | vis  | 555<br>/A/E/A       | 555<br>/H/E/A | 555<br>/K/E/A | IS-9830<br>/A/E/A    | IS-9830<br>/H/E/A    | IS-9830<br>/K/E/A    |
| 0,89                          | tief-rot                         |      | +                   | +             | +             |                      |                      |                      |
| 0,83                          | grün                             |      | +                   | +             | +             | +                    | +                    | +                    |
| 0,77                          | blau                             |      | +                   | +             | +             | hellblau             | hellblau             | hellblau             |
| 0,74                          |                                  | rot  |                     |               |               | +                    | +                    | +                    |
| 0,72                          | blau                             |      | +                   | +             | +             | nach NH <sub>3</sub> | nach NH <sub>3</sub> | nach NH <sub>3</sub> |
| 0,65                          | rot                              |      |                     |               |               | +                    | +                    | +                    |
| 0,45                          | hell/rot                         | rot  | UV: hell            | UV: hell      | UV: hell      | UV: rot<br>vis: rot  | UV: rot<br>vis: rot  | UV: rot<br>vis: rot  |
| 0,40                          | grün<br>NH <sub>3</sub> : orange | gelb |                     |               |               | +                    | +                    | +                    |
| 0,37                          | weiß<br>NH <sub>3</sub> : grün   |      | +                   | +             | +             |                      |                      |                      |
| 0,31                          | weiß/grau                        |      |                     |               |               | +                    | +                    | +                    |

Zeichenerklärung: +, Bande vorhanden; NH<sub>3</sub>, Bedampfung mit Ammoniak;  
vis, im sichtbaren Licht; UV<sub>366</sub>, unter UV-Licht ( $\lambda = 366$  nm)

Alle dünnschichtchromatographischen Untersuchungen mit den verschiedenen getesteten Sorghum-Varietäten (555, Framida, IS-9830, E-36-1, M-35-1 und IS-1037) und Behandlungen (Inkubation mit verschiedenen Elicitoren sowie Kontrollen) ergaben keine Hinweise auf eine durch Elicitierung induzierte Produktion von Substanzen in den Sorghum-Wurzeln. Die erhaltenen Bandenmuster in den DC-Läufen variierten zwar von Varietät zu Varietät, signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungen bei einer bestimmten Varietät, so z. B. das Auftreten einer oder mehrerer neuer Banden nach Elicitierung, konnten aber nicht festgestellt werden. Die einzelnen Proben zeigten z. T. unterschiedliche Bandenintensitäten – daraus konnten aber keine weitergehenden Schlüsse abgeleitet werden, da schon die Menge an eingesetzter Substanz methodenbedingt zwischen den Proben differierte. Der Vergleich der Wurzelproben von „resistenten“ Varietäten mit denen von „suszeptiblen“ zeigte keine spezifischen Bandenmuster auf, die mit einer „Resistenz“ in Zusammenhang gebracht hätten werden können.

#### 4.1.4.2 Bioautographie

In der Bioautographie wurden Wurzelexsudate und -extrakte daraufhin untersucht, ob sie Stoffe enthalten, die eine hemmende Wirkung auf das Wachstum der als Testorganismen eingesetzten Schimmelpilze ausüben. Als Trägermaterial wurden Kieselgel-beschichtete DC-Alufolien verwendet. Die zu testenden Proben wurden auf die DC-Platten aufgebracht, es erfolgte keine dünnschichtchromatographische Trennung! Als Kontrollen wurden die in anderen Parasit-Wirt-Systemen als Phytoalexine charakterisierten Stoffe Ayapin, Coniferylalkohol, L-Maackiain und Scopoletin sowie das Fungizid Benomyl eingesetzt. DC-Platten, die mit *Neurospora crassa*-Sporen besprüht worden waren, zeigten eine Hemmung des Pilzwachstums nur im Auftragungsbereich des Fungizids Benomyl. Der Pilz *Botrytis cinerea* zeigte auf den Platten nur eingeschränktes Wachstum, eine Hemmung fand auch hier nur im Bereich von Benomyl statt. *Cladosporium herbarum* (F92) wurde durch Benomyl gehemmt. Auch Scopoletin bewirkte eine Hemmung, wenn auch nicht so stark wie Benomyl. Allein *Aspergillus niger* zeigte ein reproduzierbares, flächendeckendes Wachstum auf den DC-Platten. Verringerter Wachstum konnte im Auftragungsbereich von Benomyl und den Phytoalexinen L-Maackiain und Coniferylalkohol festgestellt werden. Ayapin und Scopoletin zeigten keine Hemmwirkung auf *A. niger*. Von den zur Verfügung stehenden Sorghum-Varietäten standen für die Versuche die Varietäten besonders im Blickfeld, bei denen die Existenz von (ungeklärten) Resistenzmechanismen angenommen wird: Framida, IS-9830 und 555. Proben dieser Varietäten wurden nach verschiedenen Behandlungen untersucht: Inkubation der Wurzeln mit *A. niger*-Pilzsporen oder Hefezellwandbestandteilen und als Kontrollen Inkubation in H<sub>2</sub>O bidest. sowie Pflanzen unbehandelt direkt aus Gewächshauskultur. Verwendet wurden sowohl Wurzelexsudate als auch Wurzelextrakte. Untersucht wurden im Biotest u. a. Proben der Varietät Framida: Die Probe der Inkubation in H<sub>2</sub>O bidest. (Framida/A/W) sowie die H<sub>2</sub>O bidest.-Kontrolle zeigten keine Hemmwirkung auf das Wachstum von *A. niger*. Die Proben der Inkubation in Aceton (Framida/A/A) sowie der Extrakte resuspendiert in Aceton (Framida/A/E/A) und H<sub>2</sub>O bidest. (Framida/A/E/W) zeigten alle eine Hemmwirkung auf das Pilzwachstum (Abb. 4-5 DC-Platte 1, siehe Pfeile). Der Vergleich von Proben, die in Suspensionen mit *A. niger*-Sporen (Framida/A/E/A) oder Hefezellwandbestandteilen (Framida/H/E/W und Framida/H/A) inkubiert worden waren, mit Kontrollproben (Inkubation in H<sub>2</sub>O bidest.: Framida/K/E/W und Framida/K/A) ergab bei der Sorghum-Varietät Framida keine signifikanten Unterschiede. Mit der Einschränkung, daß die Probe Framida/H/A eine vergleichsweise schwache Hemmwirkung auf der DC-Platte zeigte (Abb. 4-5 DC-Platte 2, siehe Pfeile).

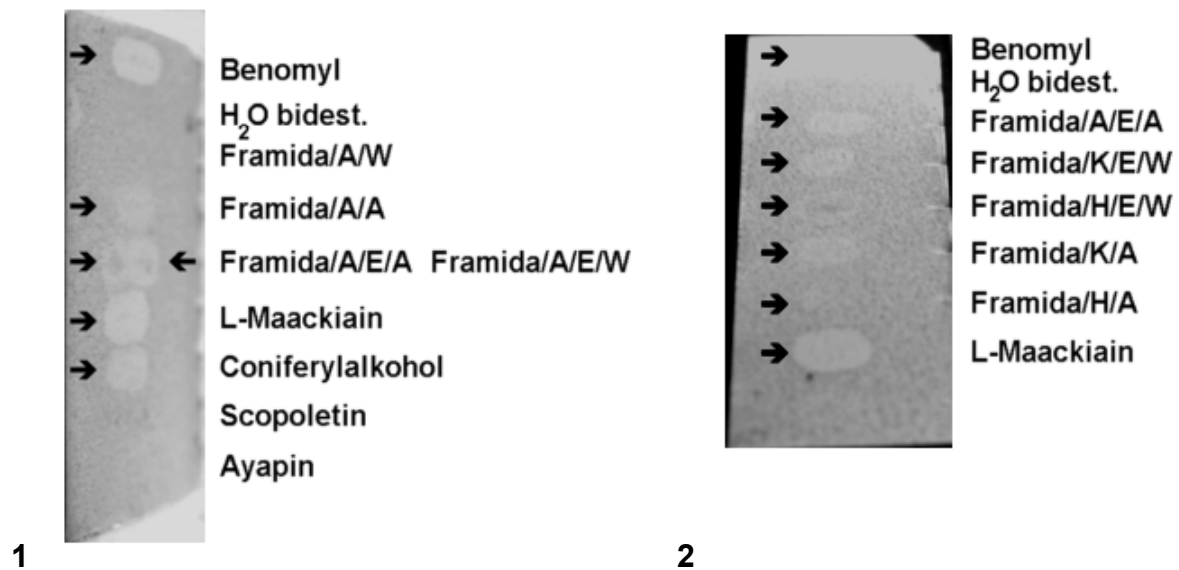


Abb. 4-5: Bioautographie – Biotest auf DC-Platte (keine dünnschichtchromatographische Trennung). Hemmzonen siehe Pfeile (➔); zwei Beispiele: Testorganismus *Aspergillus niger* ( $3 \times 10^5$  Sporen/ml); aufgetragene Volumina: 20  $\mu$ l (Benomyl 10  $\mu$ l); Kontrollen: H<sub>2</sub>O bidest., Benomyl (50 % Wirkstoff, 1,5 mg/ml), L-Maackiain (1 mg/ml), Coniferylalkohol (1 mg/ml), zusätzl. bei **1**) Scopoletin (1 mg/ml), Ayapin (1 mg/ml); Proben der Sorghum-Varietät Framida: **1**) Framida/A/W, Framida/A/A, Framida/A/E/A, Framida/A/E/W; **2**) Framida/A/E/A, Framida/K/E/W, Framida/H/E/W, Framida/K/A, Framida/H/A; Probenbeschreibung siehe Text; DC-Platten: DC-Alufohlen, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Schichtdicke 0,2 mm

In vielen Versuchen wurde die Auswertung durch die starke Färbung (braun–rot–orange) der Probenspots auf den DC-Platten erschwert. Dadurch waren Hemmhöfe nicht eindeutig zu identifizieren. Unterschiede zwischen elicitierten Proben und Kontrollen waren auch bei den Varietäten 555 und IS-9830 nicht zu erkennen. Unbehandelte Kontrollen der suszeptiblen Sorghum-Varietäten IS-1037, E-36-1 und M-35-1 zeigten im Erscheinungsbild auf der DC-Platte keine Unterschiede zu den resistenten Varietäten.

#### 4.1.5 Bestimmung des Ligningehalts von Sorghum-Wurzeln mittels <sup>13</sup>C-Festkörper-Kernspinresonanz (NMR)-Spektroskopie

Die Auflagerung von Lignin auf die Zellwände führt zur Erhöhung der mechanischen Festigkeit, man spricht von Verholzung. Dies könnte das Vordringen des parasitischen Haustoriums verhindern oder zumindest hemmen. Für die quantitative Bestimmung des Lignin-Gehalts junger Wurzelteile verschiedener *Sorghum bicolor*-Varietäten wurden Wurzelproben mittels <sup>13</sup>C-Festkörper-Kernspinresonanz (NMR)-Spektroskopie untersucht. Hierfür waren 30 Tage-alte *S. bicolor*-Pflanzen der Varietäten N-13, 555, Framida, IS-9830, Seredo und E-36-1 auf einem Versuchsfeld in Cinzana, Mali (Westafrika) möglichst mit ihrem gesamten Wurzelwerk ausgegraben worden.

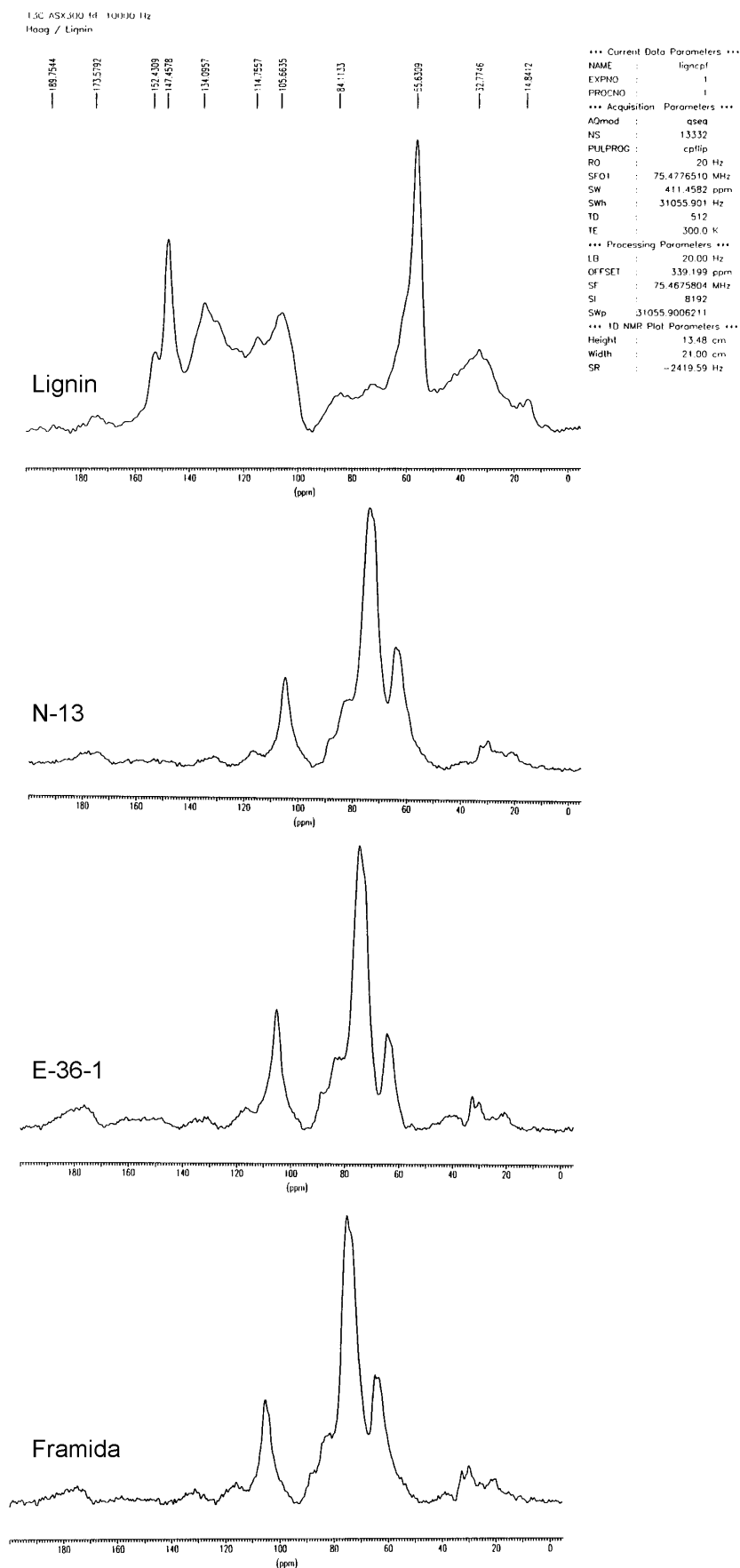


Abb. 4-6:  $^{13}\text{C}$ -Festkörper-NMR-Spektren (300 MHz) von Lignin (aus Fichtenholz als Standard) und Wurzelproben verschiedener *Sorghum bicolor*-Varietäten (junge Wurzeln, pulverisiert).



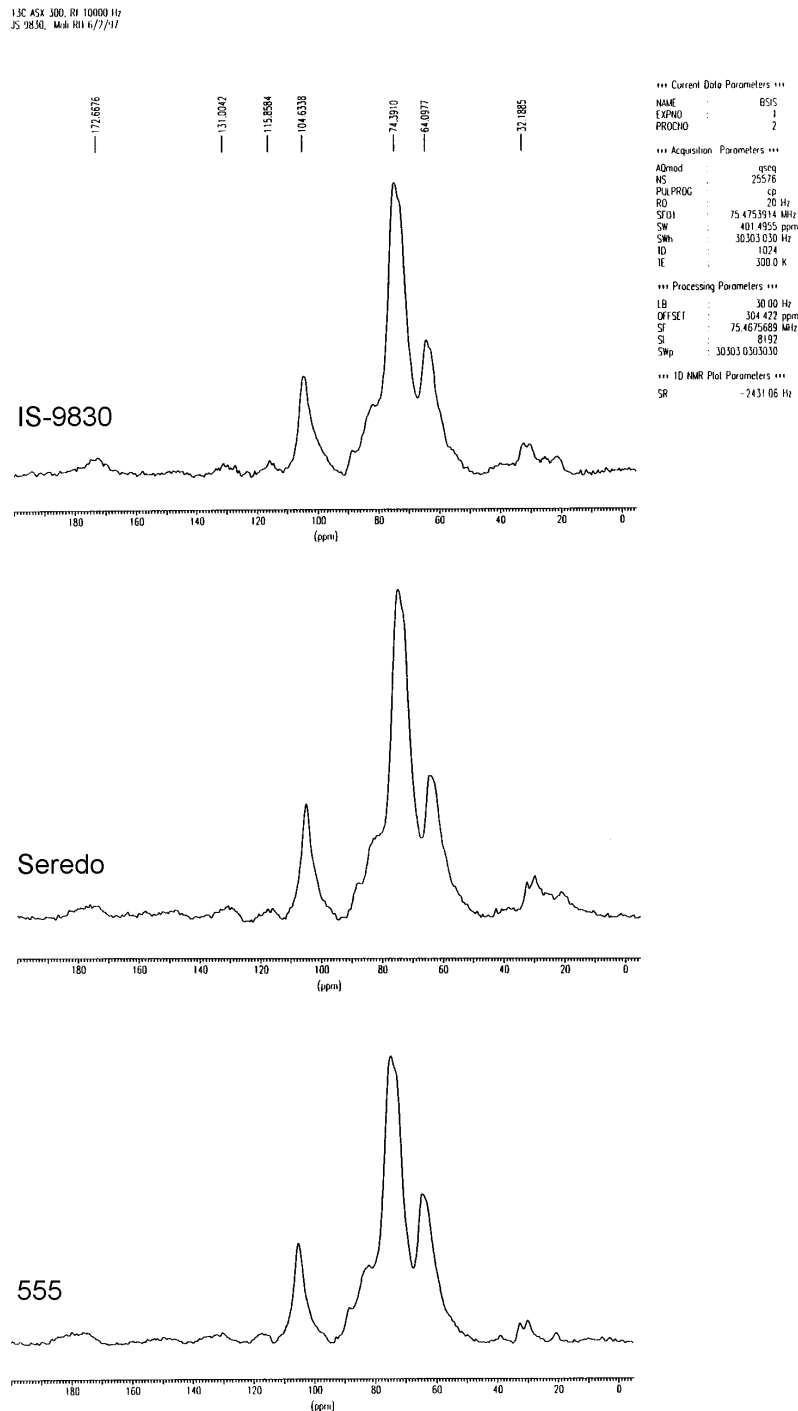


Abb. 4-7:  $^{13}\text{C}$ -Festkörper-NMR-Spektren (300 MHz) von Wurzelproben verschiedener *Sorghum bicolor*-Varietäten (junge Wurzeln, pulverisiert).

Anschließend waren die Wurzelballen vom Rest der Pflanze abgetrennt, gewaschen und anschließend getrocknet worden. Junge Wurzelteile wurden in einer Kugelmühle mit Wolfram-Karbid-Kugeln pulverisiert.  $^{13}\text{C}$ -Festkörper-NMR-Spektren wurden mit jeweils 200 mg der Wurzelproben und einem Ligninpräparat als Standard bei 300 MHz aufgenommen (Abb. 4-6 und 4-7). Beim Lignin-Standard handelte es sich um ein kommerziell erhältliches Präparat aus Fichtenholz.

Der Vergleich mit den Sorghum-Proben war aber durchaus möglich, da die Lignine verschiedenster Herkunft ein fast identisches NMR-Spektrum besitzen<sup>8</sup>. In den Spektren der Sorghum-Wurzelproben konnten die charakteristischen Peaks des Lignin-Spektrums nicht identifiziert werden. Auch wenn man davon ausgehen mußte, daß in den Spektren der Wurzelproben einige Lignin-Peaks durch andere Stoffe überlagert wurden, so müßten doch die Verhältnisse der Peakhöhen der Lignin-Peaks mit unterschiedlicher chemischer Verschiebung zueinander erhalten bleiben. Eine solche Relation der Peaks in den Spektren konnte aber nicht festgestellt werden. Der Vergleich der Wurzelproben-Spektren untereinander zeigte keine signifikanten Unterschiede auf, insbesondere unter Berücksichtigung der Peaks aus dem Lignin-Spektrum. Insoweit konnten auch keine Unterschiede zwischen resistenten und suszeptiblen Varietäten festgestellt werden. Auch das Spektrum der Wurzelprobe der Varietät N-13, für die mechanische Resistenzfaktoren postuliert wurden, unterschied sich nicht signifikant von den Spektren der anderen Varietäten.

## 4.2 *Striga hermonthica*

### 4.2.1 Bestimmung der Keimfähigkeit der Samen im TTC-Test

Die Keimfähigkeit von *Striga hermonthica*-Samen wurde mit dem TTC-Test an Samen der Herkunft Mali 95 (M/95) beispielhaft bestimmt. Die Auswertung der Versuche erwies sich als schwierig, da die Entscheidung, welche Samen als rotgefärbt einzustufen waren, nicht immer zweifelsfrei zu treffen war. Neben rotgefärbten und weißen Samen gab es auch die verschiedensten Farbnuancen. Es wurden nur die Samen als TTC-positiv gewertet, die eine deutliche Rotfärbung besaßen (Tab. 4-5). Der Anteil TTC-positiver *S. hermonthica*-Samen betrug in den Experimenten 37–44 %.

Tab. 4-5: Anteil der im TTC-Test positiven Samen von *Striga hermonthica* der Herkunft Mali 95 (M/95). Drei Experimente

|                 | Experiment |    |    |
|-----------------|------------|----|----|
|                 | 1          | 2  | 3  |
| TTC positiv [%] | 37         | 44 | 42 |

<sup>8</sup> K. Wegmann, Institut für Pflanzenbiochemie, Universität Tübingen, persönliche Mitteilung.

## 4.2.2 Keimung

### 4.2.2.1 Konditionierung

Die Länge der für eine maximale Keimungsrate optimalen Konditionierungsdauer wurde mit *S. hermonthica*-Samen der Herkunft Mali 95 (M/95) in zwei Experimenten mit je drei Parallelen bestimmt. Die Keimungsinduktion erfolgte mit dem Keimungsstimulans GR 24 (Abb. 4-8). Ohne Konditionierung lag die Keimungsrate im Durchschnitt bei rund 4 %. Mit zunehmender Konditionierungsdauer stieg die Keimungsrate anfangs steil an. Nach acht Tagen Konditionierungsdauer lag sie bei 40–54 %. Wurde die Konditionierungsdauer weiter verlängert, kam es nur noch zu einer vergleichsweise geringen Steigerung der Keimungsrate auf 55–65 %. Die maximale Keimungsrate, die überhaupt in einem Experiment (dieser Arbeit) erzielt worden war, lag bei 71 %. Nach etwa 25 Tagen Konditionierungsdauer sank die Keimungsrate langsam ab.

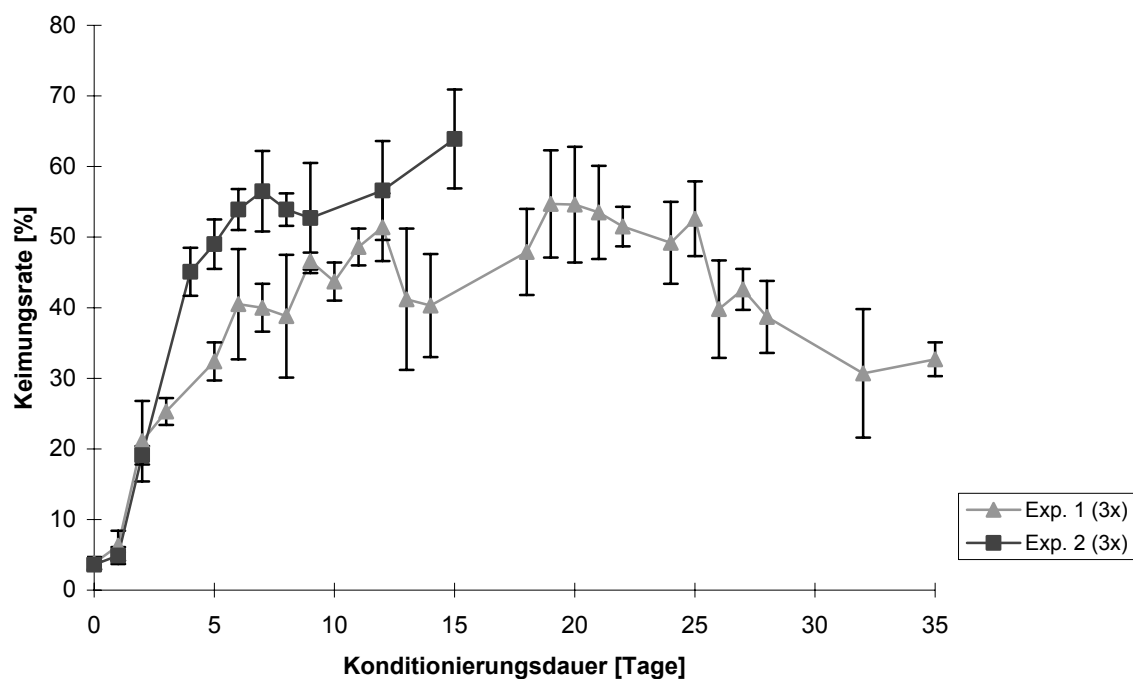


Abb. 4-8: Konditionierung von *Striga hermonthica*-Samen – Keimungsrate *S. hermonthica*-Samen aus Mali 95 (M/95) in Abhängigkeit von der Konditionierungsdauer. Keimungsinduktion mit 0,03 ppm GR 24; Auswertung vier Tage nach Induktion; Keimungsrate [%] und Standardabweichung; zwei Experimente mit jeweils drei Parallelen

#### 4.2.2.2 Keimungsinduktion

##### 4.2.2.2.1 Keimungsstimulans GR 24

Die Konzentration des Keimungsstimulans GR 24 wurde in den Testansätzen von  $3 \times 10^{-8}$  bis 3 ppm variiert (Abb. 4-9). Die minimale Konzentration an Keimungsstimulans GR 24, bei der eine signifikante Keimung von *S. hermonthica*-Samen induziert worden war, lag bei  $3 \times 10^{-6}$  ppm (1 % Keimungsrate). Die Keimungsrate stieg bis auf 67 % im Mittel bei einer Konzentration von 0,3 ppm. Eine Erhöhung auf 3 ppm brachte keine weitere Steigerung der Keimungsrate. Die standardmäßig verwendete Konzentration von 0,03 ppm GR 24 führte zu einer für die Versuche ausreichenden Keimungsrate von 57 % im Mittel.

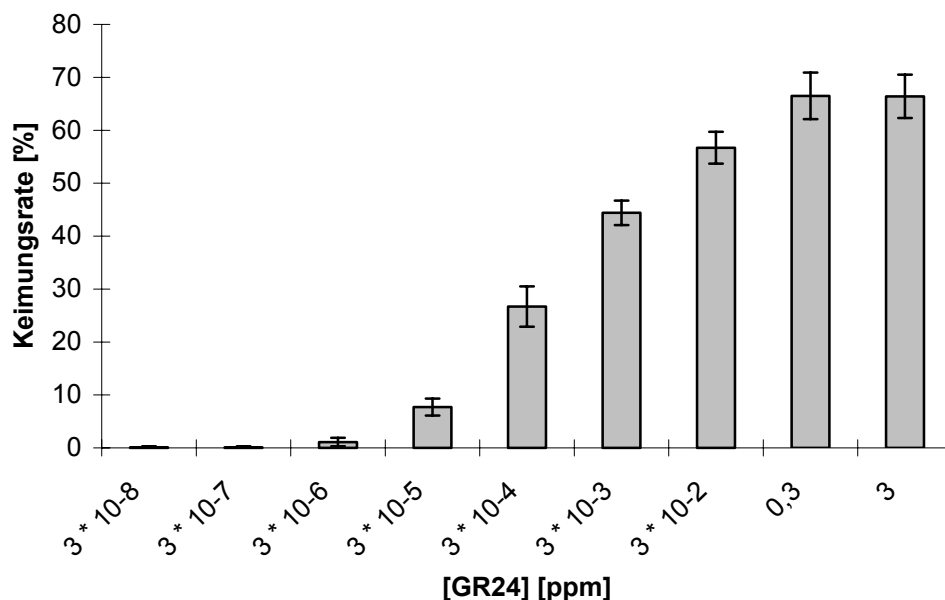


Abb. 4-9: Induktion der Keimung von *Striga hermonthica*-Samen aus Mali 95 (M/95) mit GR 24-Lösungen verschiedener Konzentration. Samen acht Tage konditioniert; Auswertung vier Tage nach Induktion; Keimungsrate [%] und Standardabweichung; drei Parallelen

##### 4.2.2.2.2 Anzahl der Samen im Test

Die Keimungsrate der *S. hermonthica*-Samen variierte mit der unterschiedlich langen Konditionierungsdauer der drei Experimente (Abb. 4-10). Bei der Betrachtung der Meßergebnisse getrennt für jede Reihe mit einer bestimmten Konditionierungsdauer zeigte sich jedoch keine Tendenz zu höherer oder niedrigerer Keimungsrate in Abhängigkeit der Zahl an Samen im Testansatz. Die Gesamtzahl der Samen in den Keimungstests hatte somit keinen direkten Einfluß auf die Keimungsrate.

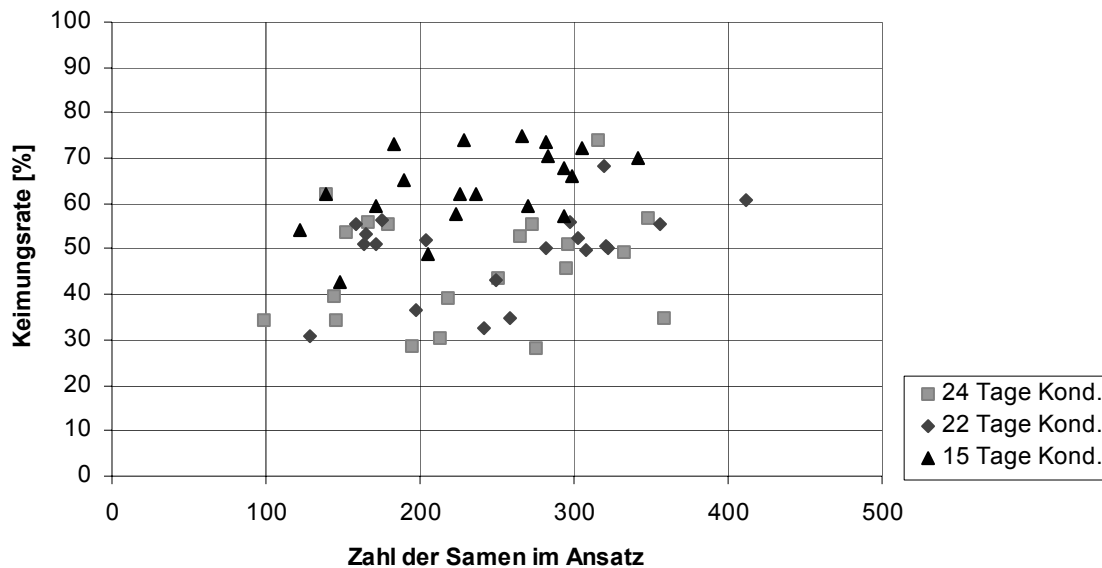


Abb. 4-10: Keimungsrate von *Striga hermonthica*-Samen aus Mali 95 (M/95) in Abhängigkeit von der Zahl an Samen im Testansatz. Drei verschiedene Längen der Konditionierung (15, 22 und 24 Tage), Keimungsinduktion mit 0,03 ppm GR 24; Auswertung vier Tage nach Induktion; Keimungsrate [%]

### 4.2.3 Haustorialentwicklung

#### Induktion durch 2,6-Dimethoxy-p-benzochinon

Die Zugabe des Haustorialinduktors 2,6-Dimethoxy-p-benzochinon (engl. 2,6-dimethoxybenzoquinone, 2,6-DMBQ) zu gekeimten Samen bewirkte in allen Versuchen keine sichtbare morphologische Veränderung der Keimwurzeln. Viele Keimwurzeln zeigten bereits nach der Keimungsinduktion mit GR 24-Keimungsstimulans oder Wurzelexsudaten feine Härchen entlang der Wurzel und besonders an der Spitze. Durch Zugabe von 2,6-DMBQ wurden keine neuen Wurzelhaare gebildet. Keimwurzeln ohne Härchen nach der Keimungsinduktion zeigten diese auch nicht nach Zugabe von 2,6-DMBQ.

### 4.2.4 Pflanzenanzucht

#### Anzucht von *Striga hermonthica* in verschiedenen Systemen

##### 4.2.4.1 Anzucht auf den Wirten Sorghum und Millet im Topfversuch

*Striga hermonthica* ließ sich auf den Wirten Sorghum und Millet in Töpfen im Gewächshaus anziehen. Dies gelang erwartungsgemäß auf suszeptiblen Varietäten, allerdings zeigten auch die resistenten Varietäten einen *Striga*-Befall, wenn auch in geringerem Maße. Doch nicht in

jedem Topfversuch kam es zur Entwicklung von einer oder mehreren *S. hermonthica*-Pflanzen. Entwickelten sich *Striga*-Sprosse, so starben diese manchmal rasch ab: Kleine, erst wenige Tage oberirdisch sichtbare *S. hermonthica*-Pflänzchen zeigten plötzlich eine schwarze Verfärbung der Blattspitzen. Die Schwarzfärbung breitete sich dann von den Spitzen auf das gesamte Blatt aus. Der Prozeß begann bei den oberen Blättern und setzte sich dann nach unten fort. Schließlich wurde die gesamte Pflanze welk und vertrocknete. Eine Pilzinfektion (z. B. mit *Fusarium* sp.) konnte nicht festgestellt werden.

Die Art der *Striga*-Samenvorbehandlung (unbehandelt, oberflächensterilisiert, oberflächensterilisiert und konditioniert) hatte keinen signifikanten Einfluß auf die Infektionseffizienz von *Striga* auf Sorghum im Topfversuch. Obwohl bei den Experimenten mit Samen der *Striga hermonthica*-Herkunft Mali 95 (M/95), die oberflächensterilisiert und konditioniert worden waren, die Zahl der Pflanzen pro Topf rund 50 % unter den beiden anderen Behandlungsmethoden lag, war dies aufgrund der großen Streuung der Meßwerte nicht als signifikant zu bewerten. Die Streuung der Meßwerte war bei *S. hermonthica* der Herkunft Mali 95 (M/95) insgesamt stärker als bei der Herkunft Kenia 94 (K/94) (Abb. 4-11).

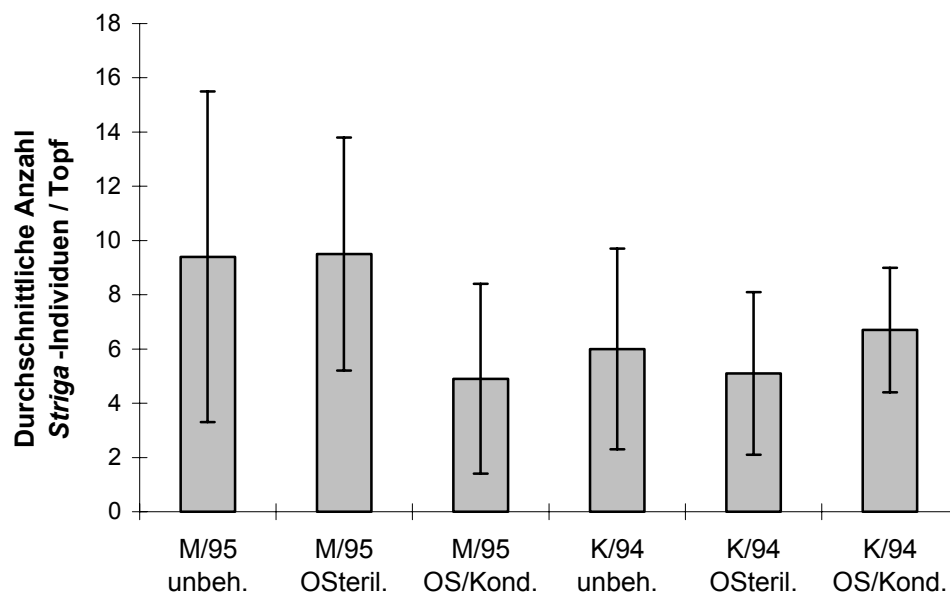


Abb. 4-11: Infektionseffizienz im Topfversuch von zwei *Striga hermonthica*-Herkünften auf der suszeptiblen *Sorghum bicolor*-Varietät CSM-209 bei unterschiedlicher *Striga*-Samenvorbehandlung. *Striga*-Herkünfte: Mali 95 (M/95) und Kenia 94 (K/94); Vorbehandlung: unbehandelt (unbeh.), oberflächensterilisiert (OSteril.), oberflächensterilisiert und 8 Tage konditioniert (OS/Kond.); Anzucht im Gewächshaus; pro Behandlung 10 Parallel-Töpfe (bei OS/Kond. 14 Parallel-Töpfe); durchschnittliche Anzahl der *Striga*-Individuen pro Topf und Standardabweichung

#### 4.2.4.2 Cokulturen *Striga hermonthica* – *Sorghum bicolor* in Petrischalen

Die Keimung von *S. hermonthica*-Samen der Herkünfte Mali 95 (M/95) und Kenia 94 (K/94) wurde von allen getesteten Sorghum-Varietäten (N-13, 555, Framida, IS-9830, Seredo, E-36-1, M-35-1, DS-1195, IS-1037, CSM-209 und CSM-335) in den Petrischalen induziert. Dies gelang in allen Testsystemen – auf Cellulose- und Glasfaser-Filtrierpapieren sowie eingebettet in Wasseragar. Die *Striga*-Keimwurzeln zeigten zwar ein Elongationswachstum – ein gerichtetes Wachstum auf eine Sorghum-Wirtswurzel hin war aber nicht festzustellen. In einigen Versuchen bildeten sich an den Keimwurzeln, besonders an der Spitze, Härchen aus. Eine signifikante Tendenz zur Ausbildung dieser Härchen in der Nähe bestimmter Sorghum-Varietäten trat nicht auf. Die Etablierung eines Haustoriums und die weitere Sproßentwicklung konnte nur in einem Versuch, nämlich an Wurzeln der (resistenten?) Sorghum-Varietät N-13 auf Cellulose-Filtrierpapier, beobachtet werden (Abb. 4-12). Deutlich sichtbar war die rötliche Verfärbung der Sorghum-Wurzel rings um die Penetrationsstelle, die vermutlich von einer hypersensitiven Reaktion herrührte. Nach dem *Attachment* wurden die grünen Kotyledonen ausgebildet (Abb. 4-12 Bild 1). Es folgte ein Sproßwachstum unter der Anlage weiterer Blätter. An der Sproßbasis kam es zur Ausbildung einer knollenförmigen Verdickung (Abb. 4-12 Bild 2). Innerhalb von zwei Wochen erreichte der zunächst grüne Sproß eine Größe von ca. 1 cm, anschließend verfärbte er sich schwarz und starb ab.

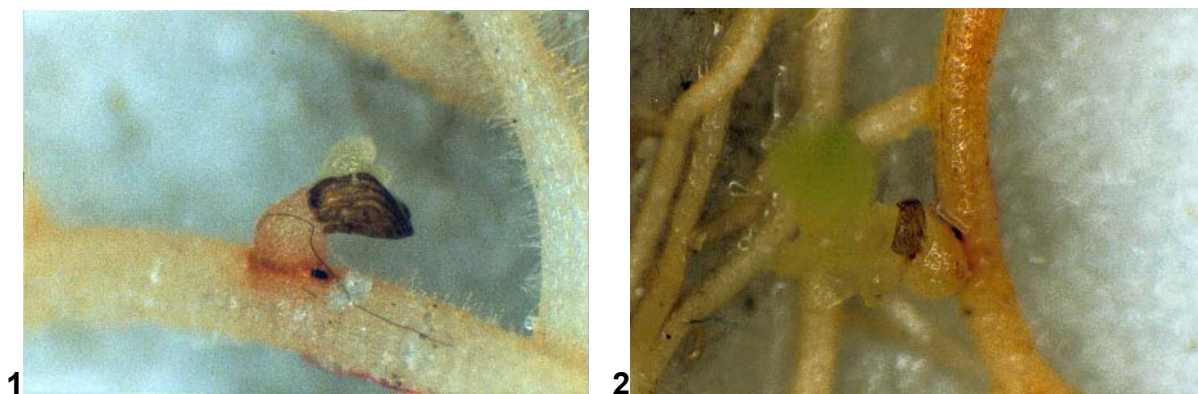


Abb. 4-12: *Striga hermonthica* – *Attachment* in Cokultur mit der *Sorghum bicolor*-Varietät N-13.

**1)** *S. hermonthica*-Keimwurzel penetriert *Sorghum bicolor*-Wurzel: Sichtbar ist die rötliche Verfärbung der Sorghum-Wurzel um die Penetrationsstelle, die vermutlich von einer hypersensitiven Reaktion herrührt. Hinter der Samenschale sind die grünen Kotyledonen zu erkennen. **2)** Sproßwachstum von *S. hermonthica* anderthalb Wochen nach Befall: Sproßhöhe rund 1 cm, knollenförmige Verdickung an der Sproßbasis

#### 4.2.4.3 *In vitro*-Kulturen

##### 4.2.4.3.1 Gewebekulturen aus Achselknospen

Sproßabschnitte mit jeweils zwei Achselknospen wurden in Nährmedien mit verschiedenen Hormonzusätzen gesteckt. Für das Phytohormon Gibberellinsäure ( $GA_3$ ) wurde der Konzentrationsbereich von 0 bis 2 ppm, für Indolessigsäure (IES) von 0 bis 0,1 ppm variiert. Die Regenerationsfähigkeit der Explantate wurde bonitiert (Tab. 4-6). Dazu wurde eine Einteilung in vier Klassen vorgenommen: Gut regenerierende Explantate (++) bildeten von den Achselknospen neue Seitentriebe mit mehreren Blättern aus. Explantate (+) regenerierten, bildeten auch Seitentriebe aus, die aber ein nicht so starkes Wachstum zeigten. Auch die Zahl der neugebildeten Blätter war geringer. Explantate ohne Regenerationsvermögen (–) zeigten keine Weiterentwicklung. Bei den Explantaten, die mit „●“ gekennzeichnet sind, kam es nicht zur Anlage von Seitentrieben. Stattdessen trat Kallusbildung ein: Es kam zu Zellwucherungen im Bereich der Kontaktfläche zum Medium.

Tab. 4-6: Regeneration von Sproßabschnitten von *Striga hermonthica* aus Mali 95 (M/95) *in vitro* auf MS-Nährmedien mit Hormonzusätzen von Gibberellinsäure ( $GA_3$ ) und Indolessigsäure (IES) in verschiedenen Konzentrationen.

| $GA_3$ [ppm] | IES [ppm] |      |      |     |
|--------------|-----------|------|------|-----|
|              | 0         | 0,02 | 0,05 | 0,1 |
| 0            | ●         | ●    | –    | –   |
| 0,5          | ●         | ●    | +    | –   |
| 1            | ●         | ●    | +    | ++  |
| 2            | +         | +    | ++   | ++  |

Zeichenerklärung: ++, gute Regeneration; +, Regeneration; –, keine Regeneration;  
●, Kallusbildung

Die höchste Regenerationsrate mit der stärksten Sproßbildung (Seitentriebe) und den vitalsten Pflanzen wurde unter Verwendung der höchsten Konzentrationen an  $GA_3$  (2 ppm) und IES (0,1 ppm) erzielt. Es war jedoch äußerst schwierig, sterile Kulturen zu erhalten, da die Oberflächensterilisation des Ausgangsmaterials sich als nicht ausreichend herausstellte. Wurden härtere Bedingungen für die Oberflächensterilisation angewendet, z. B. eine längere Inkubationsdauer in 70%igem Ethanol und Natriumhypochlorit (NaOCl)-Lösung und/oder höhere Konzentrationen an NaOCl, so kam es zum weißlichen Ausbleichen des Gewebes besonders an den Schnittstellen, z. T. bekamen die Enden auch ein glasiges Aussehen. Diese Explantate regenerierten keine neuen Pflanzen.



#### 4.2.4.3.2 *In vitro*-Kulturen aus Samen

Für die *In vitro*-Kultivierung von *S. hermonthica* aus Samen wurden verschiedene Kulturmedien zur Keimungsinduktion und zum Wachstum getestet. Eingesetzt wurden Samen der Herkünfte Mali 95 (M/95) und Kenia 94 (K/94). Alle Medien basierten auf MS-Medium, das um Phytohormone und andere (möglicherweise) physiologisch-aktive Substanzen ergänzt wurde. Neben dem Zusatz von Zeatin-ribosid, Gibberellinsäure (GA<sub>3</sub>) und dem Keimungsstimulans GR 24 (Tab. 4-7) wurden auch Cokulturen getestet. Bei den Cokulturen wurden Wurzeln von Süßkartoffeln (*Ipomoea batatas*) dem MS-Medium beigegeben, oder *Sorghum bicolor*-Pflanzen wuchsen mit ihren Wurzeln im MS-Medium. Beide Cokultur-Systeme waren in der Lage, die Keimung von *S. hermonthica*-Samen sowohl der Herkunft Mali 95 als auch Kenia 94 auszulösen und die Entwicklung zu kleinen Pflanzen zu fördern.

Tab. 4-7: Samenkeimung und erste Entwicklung von *Striga hermonthica* aus Mali 95 (M/95) und Kenia 94 (K/94) auf verschiedenen Kulturmedien. Zahl eingesetzter Samen, erhaltene Keimlinge und entwickelte Pflanzen

| Samen-Herkunft | MS-Medium und            | Samenzahl | Keimlinge<br>(inkl. Pflanzen) | Pflanzen |
|----------------|--------------------------|-----------|-------------------------------|----------|
| M/95           | Zeatin-ribosid (0,5 ppm) | 244       | 46 (19%)                      | 17 (7%)  |
|                | Zeatin-ribosid (1,0 ppm) | 326       | 6 (2%)                        | 3 (1%)   |
|                | GA <sub>3</sub> (1 ppm)  | 220       | 0 (0%)                        | 0 (0%)   |
|                | GR 24 (3 ppm)            | 225       | 5 (2%)                        | 0 (0%)   |
| K/94           | Zeatin-ribosid (0,5 ppm) | 181       | 6 (3%)                        | 3 (2%)   |
|                | Zeatin-ribosid (1,0 ppm) | 185       | 0 (0%)                        | 0 (0%)   |
|                | GA <sub>3</sub> (1 ppm)  | 95        | 0 (0%)                        | 0 (0%)   |
|                | GR 24 (3 ppm)            | 192       | 2 (1%)                        | 0 (0%)   |

Aufgrund der (vergleichsweise) hohen Keimungsrate sowie der guten Reproduzierbarkeit wurden in allen folgenden Experimenten zur Keimungsinduktion in *In vitro*-Kulturen 0,5 ppm Zeatin-ribosid eingesetzt (Abb. 4-13 Bild 1, 2 und 3). Neben der erfolgreichen Keimung und Vermehrung der Herkünfte M/95 und K/94 konnten auch aus Samen der Herkünfte Mali 95 auf Sorghum (M/ZS/95), Mali 95 auf Millet (M/ZM/95) und Kenia 96 (K/96) *In vitro*-Pflanzen erhalten werden.

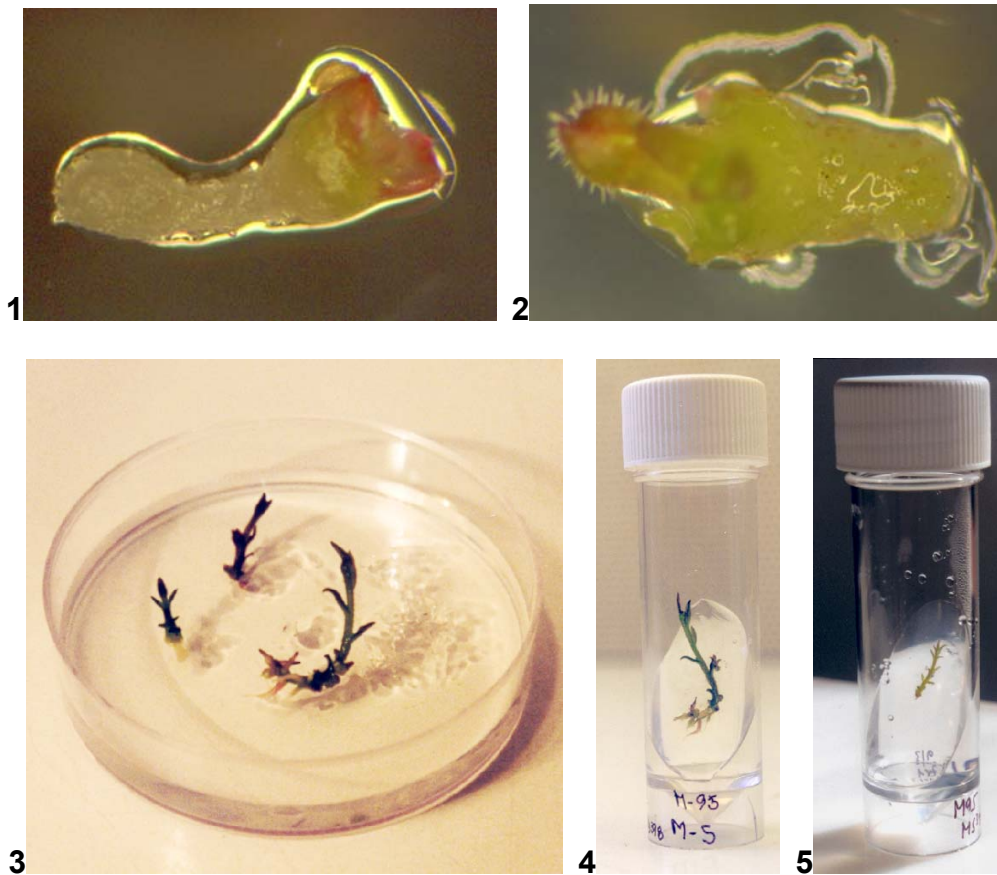


Abb. 4-13: *In vitro*-Kulturen von *Striga hermonthica* der Herkunft Mali 95 (M/95).

**1)** und **2)** erste Entwicklung kurz nach der Samenkeimung, **3)** einzelne Pflanzen umgesetzt, jeweils auf MS-Medium plus 0,5 ppm Zeatin-ribosid, **4)** und **5)** für die weitere Entwicklung nur auf MS-Medium

#### 4.2.4.3.3 Pflanzenentwicklung in den *In vitro*-Kulturen

Die kleinen Pflanzen wuchsen *in vitro* auf MS-Medium (Abb. 4-13 Bilder 4 und 5). In den Magenta-Kulturgefäßen erreichten sie eine maximale Sproßhöhe von rund 10 cm. Eine Blütenbildung setzte nicht ein. Die Pflänzchen zeigten eine geringe Wurzelbildung. Es wurden entweder nur Wurzelansätze oder aber kleine, fadenförmige Wurzeln ohne größere Verzweigungen ausgebildet. Das Medium von *S. hermonthica*-*In vitro*-Kulturen zeigte nach drei bis vier Wochen eine Braun- oder Lilafärbung. Diese resultierte aus der Abgabe von Stoffen durch die *Striga*-Pflanzen und deren Akkumulation im Medium. Blieben die Pflanzen auf diesem Medium, so wurden alle kollektiv schwarz und starben ab. Aus diesem Grund wurden *Striga*-Pflanzen alle vier Wochen auf frisches Medium umgesetzt. *S. hermonthica*-Pflanzen konnten kontinuierlich über mehr als 15 Monate hinweg klonal vermehrt und in *In vitro*-Kulturen gehalten werden, ohne daß die Pflanzen an Vitalität verloren.

#### 4.2.4.3.4 Untersuchung von ins Nährmedium abgegebenen Stoffen

Die färbende(n) Substanz(en) im Medium konnte(n) mit den verschiedensten Lösungsmitteln (Aceton, Diethylether, Ethanol, Ethylacetat, H<sub>2</sub>O bidest., Methanol, Toluol) nicht aus der Gelmatrix isoliert werden. Ansäuern (1 N HCl, Eisessig) oder die Behandlung mit Alkali (1 und 10 N NaOH) führten nicht zu einer Veränderung der Färbung.

### 4.2.5 Morphologische Charakterisierung von *Striga hermonthica*

#### 4.2.5.1 Samen

Samen von *S. hermonthica* der Herkünfte Mali 95 (M/95) und Kenia 94 (K/94) wurden unter dem Lichtmikroskop untersucht. Hier zeigten sich keinerlei signifikante morphologische Unterschiede.

Darüber hinaus wurden Samen der Herkünfte Mali 95 auf Sorghum (M/95/ZS) und auf Millet (M/95/ZM), Kenia 94 (K/94) und Sudan 93 (S/93) unter dem Rasterelektronenmikroskop (REM) bei einer maximalen Vergrößerung von 5000fach untersucht. Zuvor wurde in einem Sputter eine ca. 20 nm starke Schicht aus einer Gold-Palladium-Legierung auf die Samen aufgedampft. Am REM wurden die folgenden Druckwerte eingestellt: für die Kathode  $\approx 5,3 \times 10^{-7}$  hPa und für die Probe  $\approx 2,7 \times 10^{-6}$  hPa. Abb. 4-14 zeigt Aufnahmen von beispielhaft ausgewählten Samen der verschiedenen Herkünfte. Die Auswertung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Oberflächenstrukturen der *S. hermonthica*-Samen ergab keine eindeutigen Merkmale, die spezifisch für die Samen einer bestimmten Herkunft gewesen wären. Allenfalls ließ sich bei den Samen der Herkünfte Kenia 94 (K/94) und Sudan 93 (S/93) eine gewisse Tendenz zu länger-gestreckten Segmenten auf der Oberfläche feststellen (siehe Pfeile in Abb. 4-14, Aufnahmen 3 und 4). Die kugelförmigen Elemente auf der Samenoberfläche, deutlich sichtbar in der Abb. 4-14, Aufnahmen 1 (M/ZS/95) und 2 (M/ZM/95), stellten kein Merkmal dar, das typisch nur für Samen dieser Herkünfte gewesen wäre.

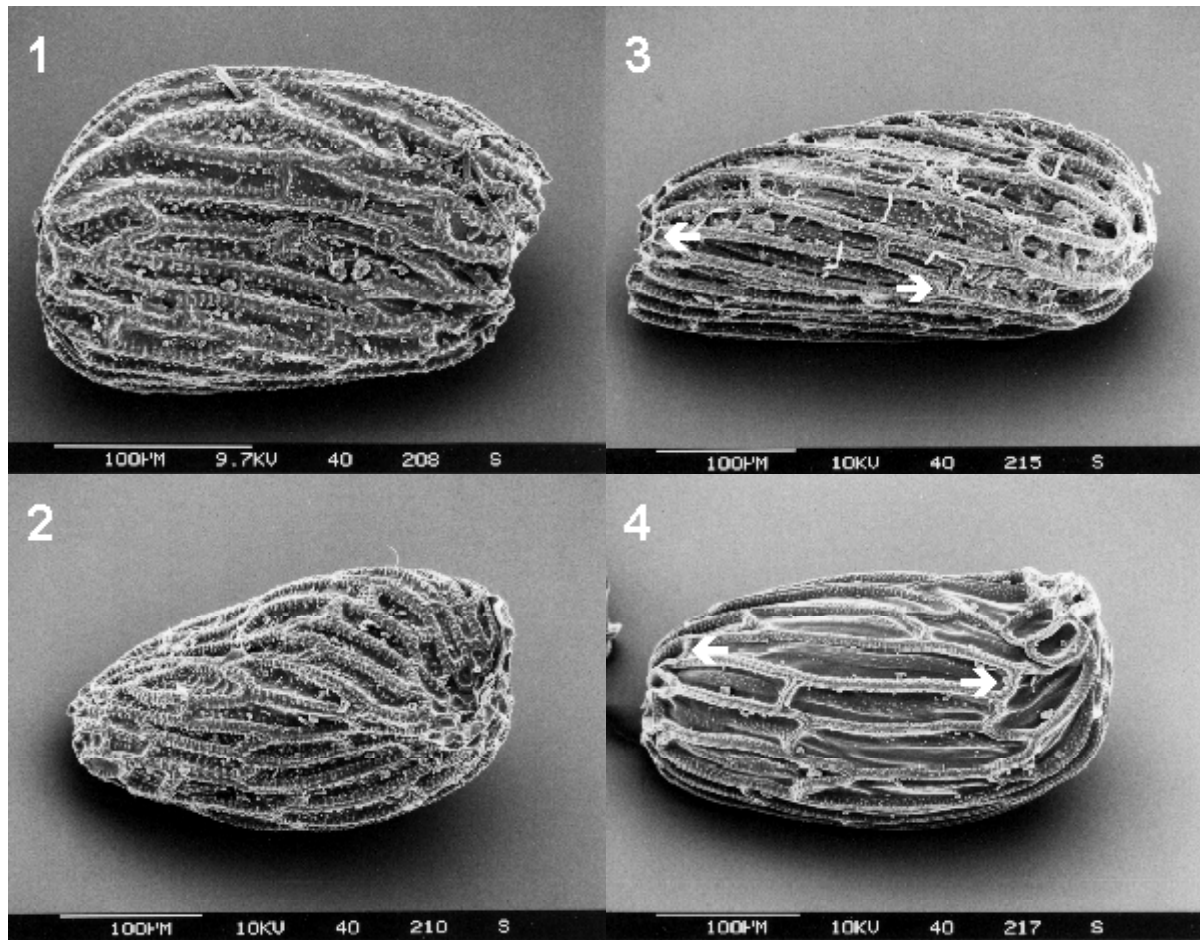


Abb. 4-14: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *Striga hermonthica*-Samen verschiedener Herkunft (Vergrößerung  $\approx 5000$ fach). Zuvor wurde eine ca. 20 nm starke Gold-Palladium-Legierung im Sputter aufgedampft. Kathode:  $\approx 5,3 \times 10^{-7}$  hPa, Probe:  $\approx 2,7 \times 10^{-6}$  hPa.  
 1) Mali 95 auf Sorghum (M/ZS/95), 3) Kenia 94 (K/94),  
 2) Mali 95 auf Millet (M/ZM/95), 4) Sudan 93 (S/93).  
 Pfeile in den Bildern 3) und 4) kennzeichnen die besonders langen Segmente auf der Oberfläche der Samen der Herkunft Kenia 94 (K/94) und Sudan 93 (S/93)

#### 4.2.5.2 Blüten

In Zusammenarbeit mit dem Taxonomen Prof. E. S. Teryokhin wurden Pflanzen von *S. hermonthica* der Herkunft Mali 95 (M/95) und Kenia 94 (K/94) auf ihre morphologischen Unterschiede hin untersucht. Das Augenmerk der taxonomischen Untersuchungen lag auf den Blütenmerkmalen (Tab. 4-8). Im Vergleich der Blüten der *S. hermonthica*-Pflanzen aus Kenia 94 (K/94) mit denen aus Mali 95 (M/95) fielen sofort die größeren Blüten der Kenia-Herkünfte ins Auge. Die Vermessung der Blütenteile bestätigte diesen Eindruck. Die Länge des Calyx war mit 11 mm bei Kenia 94 wesentlich länger als bei Mali 95 (7 mm), ebenso die Länge der Corolla: 20 Millimeter zu 15 Millimeter. Deutliche Formunterschiede traten auch bei der Gestalt der oberen Kelchblätter auf. Während bei Blüten der Herkunft Kenia 94 eine runde Kelchblattform auftrat, hatten die der Herkunft Mali 95 dagegen eine gezahnte Form.

Tab. 4-8: Taxonomische Untersuchung der *Striga hermonthica*-Pflanzen der Herkünfte Mali 95 (M/95) und Kenia 94 (K/94) – Blütenmerkmale (nach Teryokhin<sup>9</sup>).

| Merkmal                                  | Herkunft                                       |                                               |
|------------------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
|                                          | Mali 95 (M/95)                                 | Kenia 94 (K/94)                               |
| Calyx                                    |                                                |                                               |
| Länge                                    | 7 mm                                           | 11 mm                                         |
| Länge der Zähne                          | 3 mm                                           | 3–4 mm                                        |
| Oberfläche                               | dünne Härchen speziell an der Spitze der Zähne | dünne Härchen speziell an der Basis der Zähne |
| Corolla                                  |                                                |                                               |
| Länge Basis–Knick                        | 8–9 mm                                         | 14 mm                                         |
| Länge Knick–Mund                         | 6 mm                                           | 6 mm                                          |
| Länge gesamt                             | 14–15 mm                                       | 20 mm                                         |
| Länge obere Kelchblätter                 | 5–6 mm                                         | 6–7 mm                                        |
| Länge untere Kelchblätter                | 7–8 mm                                         | 5–6 mm                                        |
| Farbe                                    | pink-violett, beständig in 70%igem Ethanol     | helles pink, beständig in 70%igem Ethanol     |
| Form obere Kelchblätter                  | gezahnt                                        | rund                                          |
| Form der Ränder der oberen Kelchblätter  | gewellt mit langen Zacken                      | schwach gewellt mit kurzen Zacken             |
| Form der Ränder der unteren Kelchblätter | gewellt mit Einschnitt in der Mitte            | schwach gewellt                               |

#### 4.2.6 Genetische Variabilität von *Striga hermonthica* – Molekularbiologische Methoden

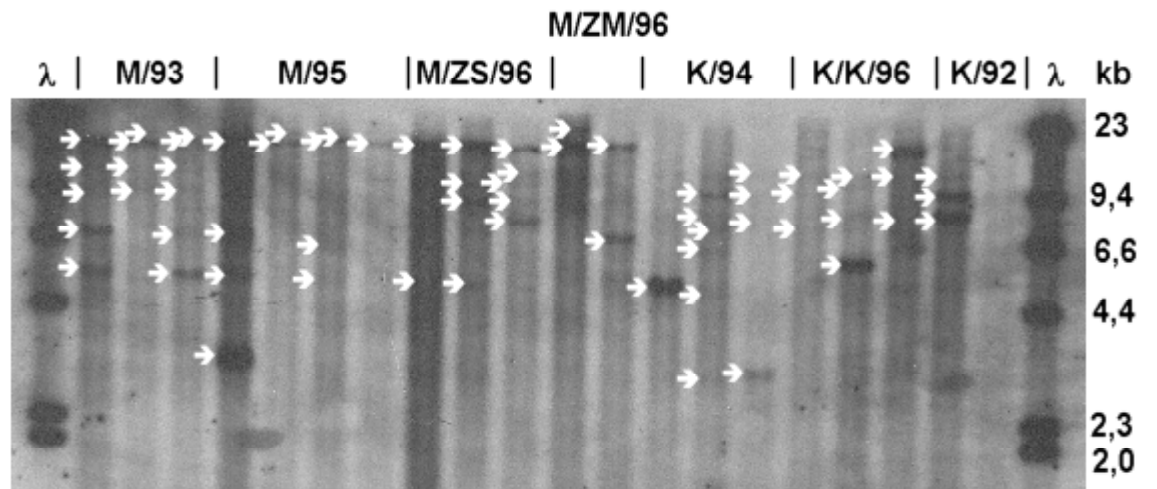
##### 4.2.6.1 DNA-Isolierung

Es wurde die Gesamt-DNA aus den Blättern 217 einzelner *S. hermonthica*-Pflanzen von verschiedenen Herkünften isoliert. Die Samen stammten aus den Ländern Ghana, Jemen, Kenia, Mali, Niger, Sudan, Tansania und Togo. Die Erntejahre lagen zwischen 1986 und 1996. Wirtspflanzen waren meist Sorghum, Millet und Mais. Die Konzentration und die Qualität der DNA wurde photometrisch bestimmt. Die Menge an Gesamt-DNA, die aus dem Blattmaterial der verschiedenen Pflanzen isoliert werden konnte, variierte von 60 bis 3000 µg. Der Quotient  $E_{260} / E_{280}$  der DNA-Proben lag zwischen 1,8 und 2,2, bei der Mehrzahl der Proben betrug er 1,9–2,0. Für die RAPD-PCR-Untersuchungen wurde die isolierte DNA zusätzlich mit RNase A verdaut.

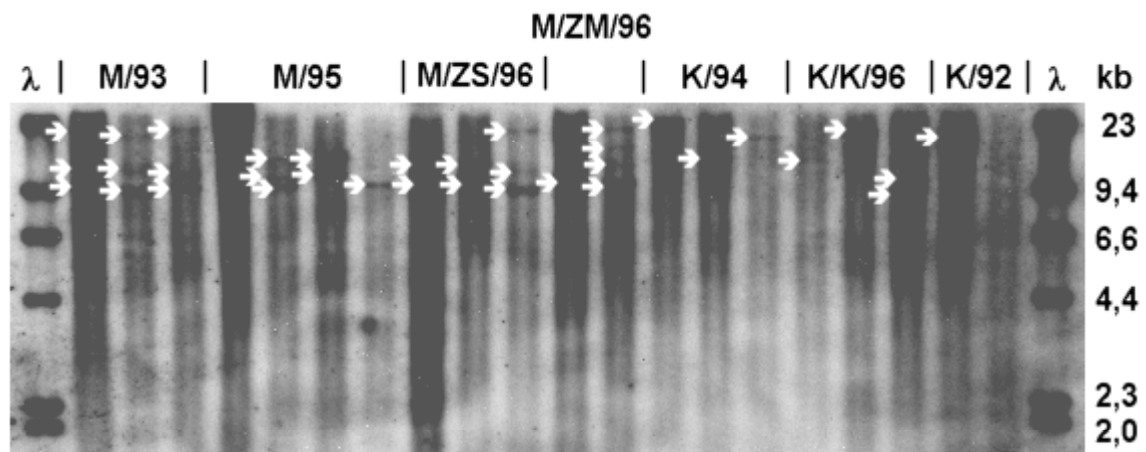
<sup>9</sup> E. S. Teryokhin, Komarov Botanisches Institut, St. Petersburg, Rußland, persönliche Mitteilung, 1997.

#### 4.2.6.2 RFLP-Analysen

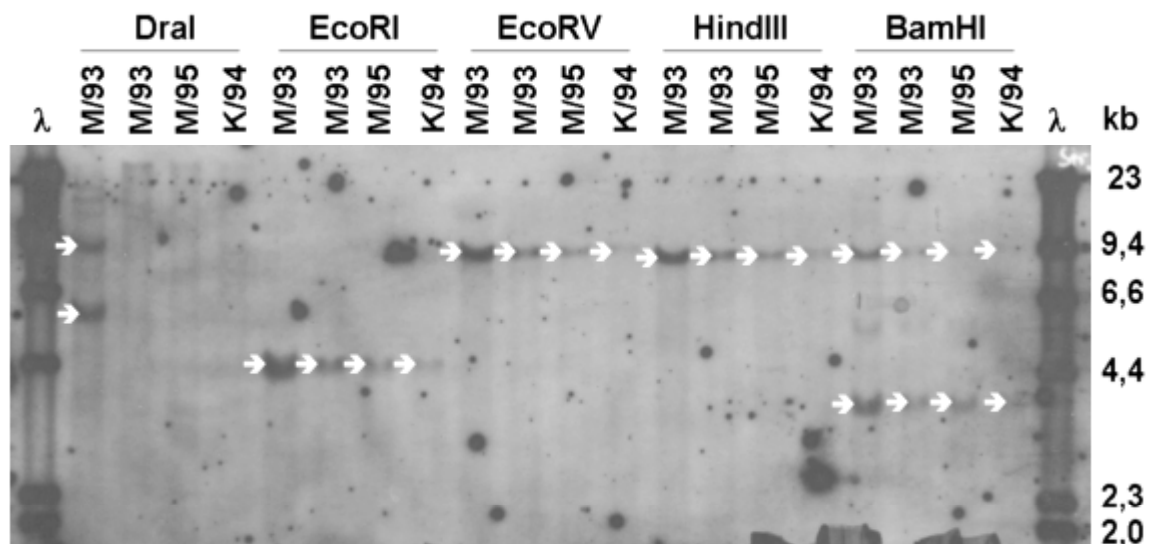
Die RFLP-Analysen wurden mit Gesamt-DNA isoliert aus den Blättern von *S. hermonthica*-Pflanzen aus Mali, Erntejahre 1993 und 1995 (M/93 und M/95) und Kenia 1994 (K/94) durchgeführt. Verdaut wurde die DNA mit folgenden Restriktionsenzymen: BamHI, DraI, EcoRI, EcoRV, HindIII, KpnI und PstI. Als Sonden wurden die Oligonukleotidsonden (GATA)<sub>4</sub>, (GACA)<sub>4</sub> und (GTG)<sub>5</sub> sowie die rDNA-Gensonden pRZ 18 und pRZ 25 verwendet. In den RFLP-Experimenten konnten mit den verwendeten Oligonukleotidsonden Polymorphismen detektiert werden. Eindeutige Bandenmuster für Pflanzen einer bestimmten Herkunft konnten aber nicht festgestellt werden. Die Bandenmuster, die mit den Sonden (GATA)<sub>4</sub> und (GACA)<sub>4</sub> erhalten wurden, waren identisch. Die rDNA-Gensonden pRZ 18 und pRZ 25 zeigten dagegen keine Polymorphismen. Häufig traten nur sehr schwache Banden auf den Filmen auf. Manche Proben zeigten auch einen „Schmier“ (unaufgelöste Banden) über die gesamte Spur. Abb. 4-15 zeigt exemplarisch drei Röntgenfilme. Der Film 1 zeigt die Bandenmuster von DNA-Proben nach dem Verdau mit dem Restriktionsenzym EcoRI. Die DNA-Proben auf Film 2 wurden mit BamHI verdaut. Es wurden jeweils verschiedene Genotypen der gleichen Herkunft analysiert. Die Detektion erfolgte in beiden Fällen mit einer DIG-markierten (GATA)<sub>4</sub>-Oligonukleotidsonde. Die Röntgenfilme zeigten für Genotypen der gleichen Herkunft (oft) verschiedene Bandenmuster. Film 3 zeigt DNA-Proben aus drei Herkunft, verdaut mit fünf unterschiedlichen Restriktionsenzymen. Die Detektion erfolgte hier einheitlich mit einer DIG-markierten rDNA-Gensonde pRZ 18. Die Bandenmuster waren für das jeweilige Restriktionsenzym für alle Herkunft gleich. Eine Ausnahme bildete hier lediglich der Verdau mit DraI. Hier konnten für drei Genotypen gar keine Banden detektiert werden.



1



2



3

Abb. 4-15: RFLP-Bandenmuster – Gesamt-DNA aus *Striga hermonthica* verschiedener Herkunft. Detektion mit dem Chemilumineszenz-Verfahren; DNA-Molekulargewichtsmarker II (λ) und Sonden DIG-markiert; **1**) mit (GATA)<sub>4</sub>-Sonde, EcoRI-verdaut; **2**) mit (GATA)<sub>4</sub>-Sonde, BamHI-verdaut (Röntgenfilm jew. 30 min exponiert); **3**) mit pRZ 18-Sonde, verschiedene Restriktionsenzyme (Röntgenfilm 60 min exponiert); rechts: Größen der Markerbanden [kb]



### 4.2.6.3 RAPD-PCR

#### 4.2.6.3.1 Untersuchungsmaterial

Zur Untersuchung mittels RAPD-PCR wurden 168 Gesamt-DNA-Proben, die aus *S. hermonthica*-Blattmaterial isoliert worden waren, ausgewählt. Die Proben umfaßten 21 Herkünfte. Die Herkünfte der samenproduzierenden *Striga*-Mutterpflanzen unterschieden sich in der geographischen Lage, im Erntejahr und in der jeweiligen Wirtspflanzenart. Neben Pflanzen, die im Gewächshaus auf Sorghum aufgezogen worden waren, wurden auch *In vitro*-Pflanzen untersucht (Tab. 4-9).

Tab. 4-9: *Striga hermonthica*-Herkünfte, untersucht mittels RAPD-PCR-Methode. *S. hermonthica*-Pflanzen wurden im Gewächshaus auf Pflanzen der *Sorghum bicolor*-Varietät CSM-209 angezogen (Ausnahmen: *in vitro*). Angaben für Ort und Wirt soweit bekannt

| Herkunft | Ort/<br>Aufzucht                                     | Wirt             | Erntejahr | Bezeichnung | Zahl der<br>untersuchten<br>Pflanzen |
|----------|------------------------------------------------------|------------------|-----------|-------------|--------------------------------------|
| Ghana    | Naes                                                 |                  | 1986      | G/Na/86     | 3                                    |
| Ghana    |                                                      |                  | 1991      | G/91        | 2                                    |
| Ghana    | Novel                                                |                  | 1992      | G/No/92     | 5                                    |
| Ghana    |                                                      |                  | 1993      | G/93        | 6                                    |
| Kenia    |                                                      |                  | 1992      | K/92        | 3                                    |
| Kenia    |                                                      |                  | 1994      | K/94        | 28                                   |
| Kenia    | Kisumu, inkl. Probe<br>aus <i>In vitro</i> -Aufzucht | Sorghum,<br>Mais | 1996      | K/K/96      | 12                                   |
| Kenia    | Kisumu                                               | Sorghum,<br>Mais | 1996      | K/G/96      | 6                                    |
| Mali     | Samanko                                              |                  | 1993      | M/93        | 9                                    |
| Mali     | Samanko                                              | Sorghum          | 1995      | M/95        | 19                                   |
| Mali     | Samanko,<br><i>In vitro</i> -Aufzucht                | Sorghum          | 1995      | M/95/iv     | 3                                    |
| Mali     | Cinzana                                              | Sorghum          | 1995      | M/ZS/95     | 21                                   |
| Mali     | Cinzana                                              | Millet           | 1995      | M/ZM/95     | 8                                    |
| Niger    |                                                      |                  | 1994      | N/94        | 5                                    |
| Sudan    |                                                      |                  | 1988/89   | S/88        | 4                                    |
| Sudan    |                                                      |                  | 1993      | S/93        | 10                                   |
| Tansania |                                                      |                  | 1994      | Ta/94       | 10                                   |
| Togo     | Kava                                                 |                  | 1988      | To/K/88     | 3                                    |
| Togo     | Savanne                                              |                  | 1988      | To/S/88     | 5                                    |
| Jemen    |                                                      |                  | 1988      | Y/88        | 6                                    |



#### 4.2.6.3.2 PCR-Bedingungen

Alle PCR-Läufe wurden unter identischen Bedingungen durchgeführt. Die Komponenten der PCR-Ansätze zeigt Tab. 4-10.

Tab. 4-10: Komponenten eines PCR-Ansatzes.

| PCR-Ansatz                                     |               |
|------------------------------------------------|---------------|
| Maßstab/Volumen                                | 50 µl         |
| Mastermix mit allen Komponenten außer DNA      |               |
| Taq-Polymerase                                 | 1 U           |
| PCR-Puffer                                     | 1×            |
| MgCl <sub>2</sub>                              | 2 mM          |
| Nukleotid-Mix                                  | 0,2 mM        |
| Primer (gleicher Primer für beide DNA-Stränge) | 0,4 µM        |
| DMSO                                           | 5 %           |
| H <sub>2</sub> O bidest., steril               | ad 46 µl      |
| Gesamt-DNA in TE-Puffer                        | 80 ng in 4 µl |

Die Amplifikation im Thermocycler erfolgte unter Verwendung des in Abb. 4-16 dargestellten Temperaturprofils. Eine weitere Optimierung der PCR-Bedingungen erwies sich als nicht notwendig.

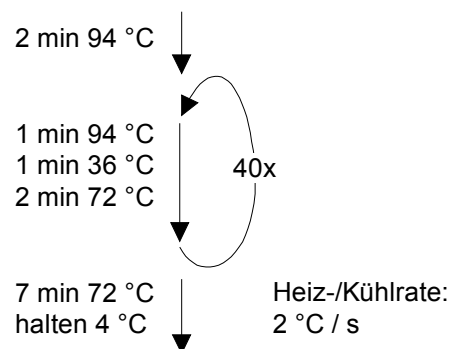


Abb. 4-16: PCR-Temperaturprofil.

#### 4.2.6.3.3 Primer

Alle fünfzehn Primer ergaben mit den DNA-Proben isoliert aus *Striga hermonthica*-Blattmaterial Amplifikationsprodukte (Banden). Für sieben Primer konnten in Vorversuchen Polymorphismen mit charakteristischen und reproduzierbaren Bandenmustern erhalten werden: STR-R1, STR-R2, STR-R6, STR-R12, STR-R13, STR-R14 und STR-R15. Diese sieben Primer wurden dann auch für die folgenden Analysen aller Genotypen herangezogen.

Für jeden der eingesetzten Primer wurde das Vorhanden- oder Nichtvorhandensein von (je nach Primer) vier bis acht Banden registriert (Tab. 4-11). Insgesamt wurden 36 RAPD-Banden als Merkmale herangezogen. Die für den entsprechenden Primer ausgewählten Banden sind in beispielhaft ausgewählten Aufnahmen von Agarosegelen (Abb. 4-17 bis 4-23) für einzelne Spuren exemplarisch markiert und numeriert.

Tab. 4-11: Ausgewählte 10mer-Primer für die phylogenetischen Untersuchungen – Sequenzen und Zahl ausgewerteter RAPD-Banden.

| Primer                           | Sequenz          | Zahl ausgewerteter RAPD-Banden |
|----------------------------------|------------------|--------------------------------|
| STR-R1                           | 5'-GTGCCTAACC-3' | 4                              |
| STR-R2                           | 5'-GCTGCGTGAC-3' | 4                              |
| STR-R6                           | 5'-TGCCGAGCTG-3' | 5                              |
| STR-R12                          | 5'-GACGGATCAG-3' | 8                              |
| STR-R13                          | 5'-GGGATATCGG-3' | 5                              |
| STR-R14                          | 5'-ACGGTACCAG-3' | 5                              |
| STR-R15                          | 5'-TGCTGCAGGT-3' | 5                              |
| Ausgewertete RAPD-Banden gesamt: |                  | 36                             |

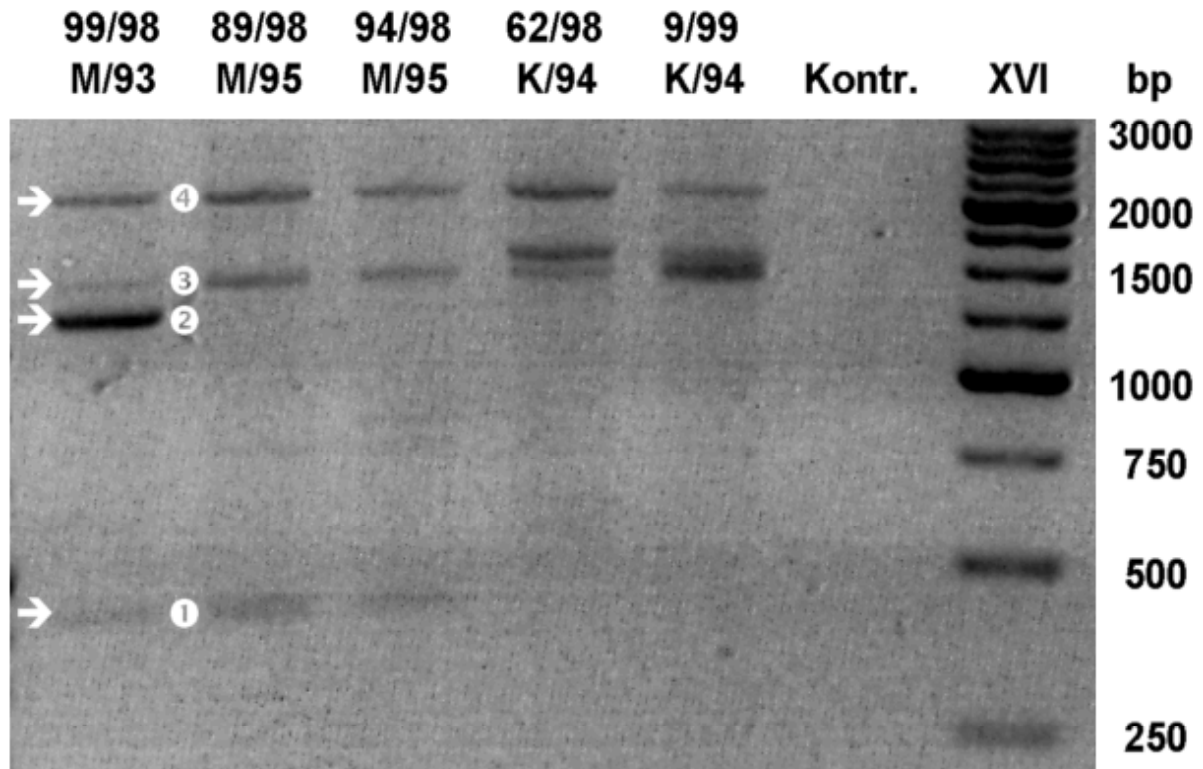


Abb. 4-17: PCR-Bandenmuster mit Primer STR-R1 – DNA einzelner *Striga hermonthica*-Pflanzen.  
Gel mit Ethidiumbromid; Aufnahme unter UV-Licht; Bezeichnung oben: DNA-Probe; Kontr.,  
Kontrolle; XVI, DNA-Molekulargewichtsmarker XVI; rechts: Größen der Markerbanden [bp]

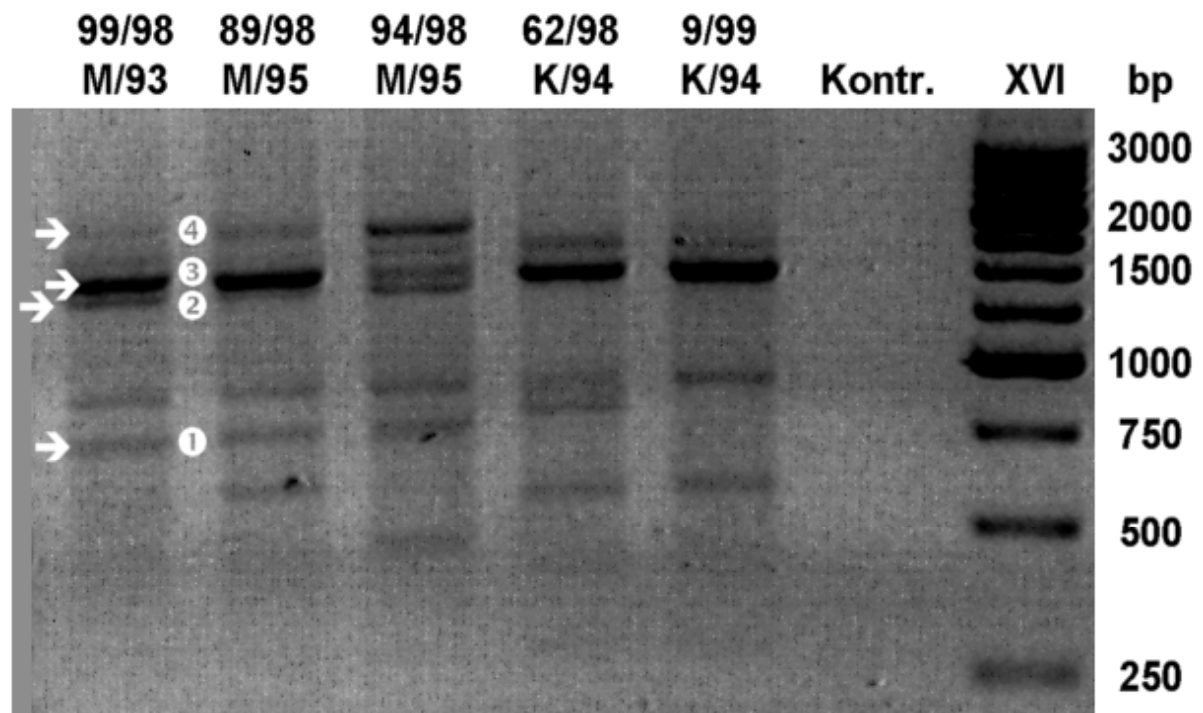


Abb. 4-18: PCR-Bandenmuster mit Primer STR-R2 – DNA einzelner *Striga hermonthica*-Pflanzen.  
Gel mit Ethidiumbromid; Aufnahme unter UV-Licht; Bezeichnung oben: DNA-Probe; Kontr.,  
Kontrolle; XVI, DNA-Molekulargewichtsmarker XVI; rechts: Größen der Markerbanden [bp]

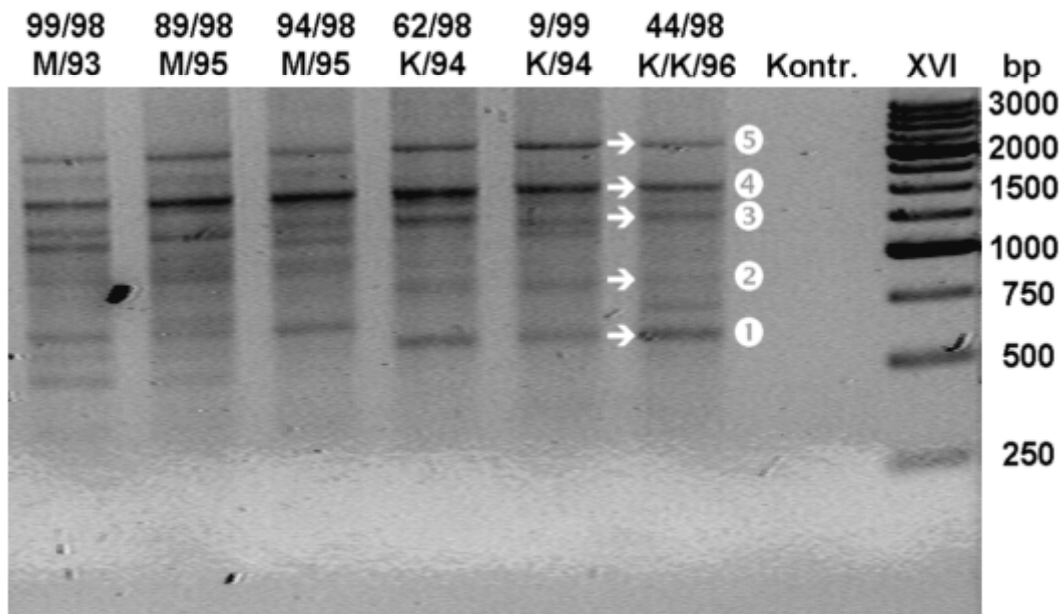


Abb. 4-19: PCR-Bandenmuster mit Primer STR-R6 – DNA einzelner *Striga hermonthica*-Pflanzen. Gel mit Ethidiumbromid; Aufnahme unter UV-Licht; Bezeichnung oben: DNA-Probe; Kontr., Kontrolle; XVI, DNA-Molekulargewichtsmarker XVI; rechts: Größen der Markerbanden [bp]

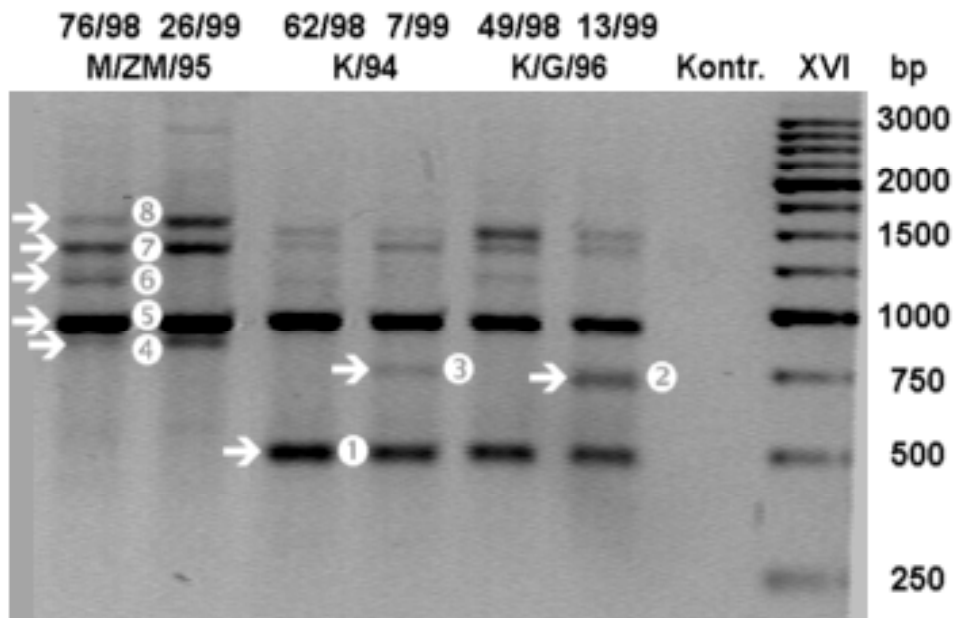


Abb. 4-20: PCR-Bandenmuster mit Primer STR-R12 – DNA einzelner *Striga hermonthica*-Pflanzen. Gel mit Ethidiumbromid; Aufnahme unter UV-Licht; Bezeichnung oben: DNA-Probe; Kontr., Kontrolle; XVI, DNA-Molekulargewichtsmarker XVI; rechts: Größen der Markerbanden [bp]

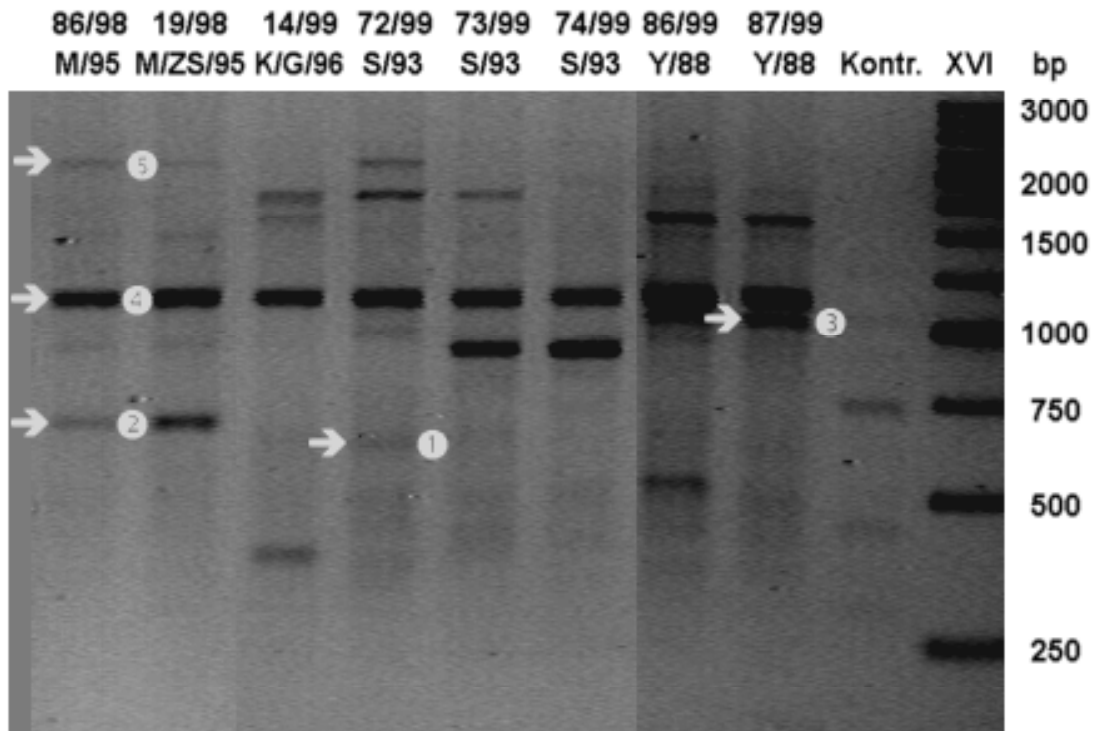


Abb. 4-21: PCR-Bandenmuster mit Primer STR-R13 – DNA einzelner *Striga hermonthica*-Pflanzen (Gelausschnitte). Gel mit Ethidiumbromid; Aufnahme unter UV-Licht; Bezeichnung oben: DNA-Probe; Kontr., Kontrolle; XVI, DNA-Molekulargewichtsmarker XVI; rechts: Größen der Markerbanden [bp]

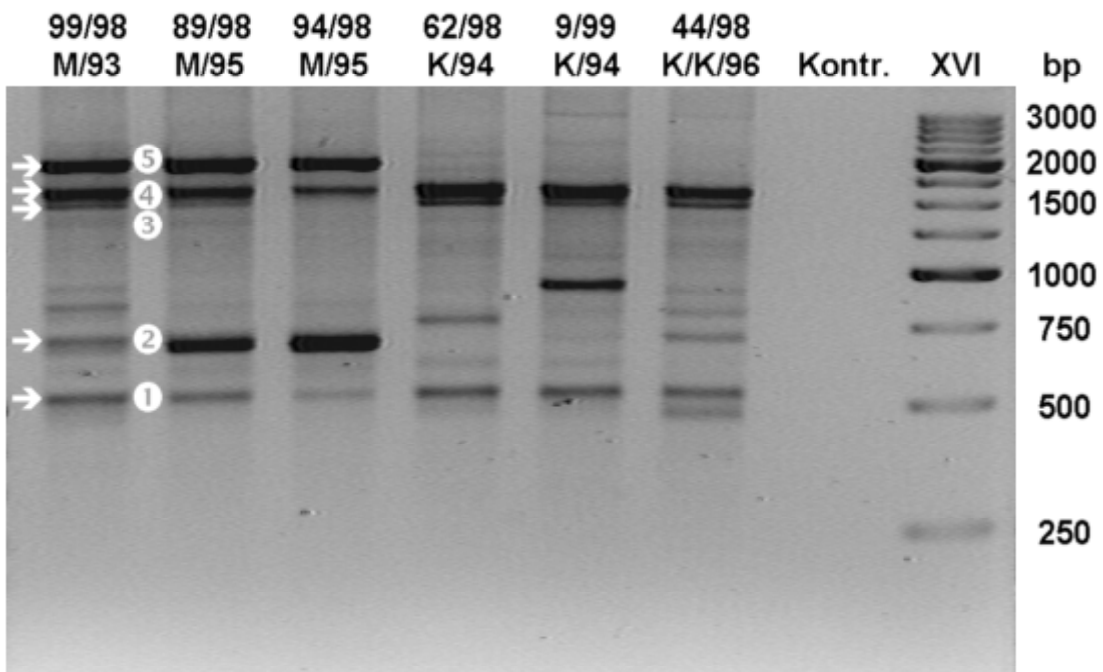


Abb. 4-22: PCR-Bandenmuster mit Primer STR-R14 – DNA einzelner *Striga hermonthica*-Pflanzen. Gel mit Ethidiumbromid; Aufnahme unter UV-Licht; Bezeichnung oben: DNA-Probe; Kontr., Kontrolle; XVI, DNA-Molekulargewichtsmarker XVI; rechts: Größen der Markerbanden [bp]

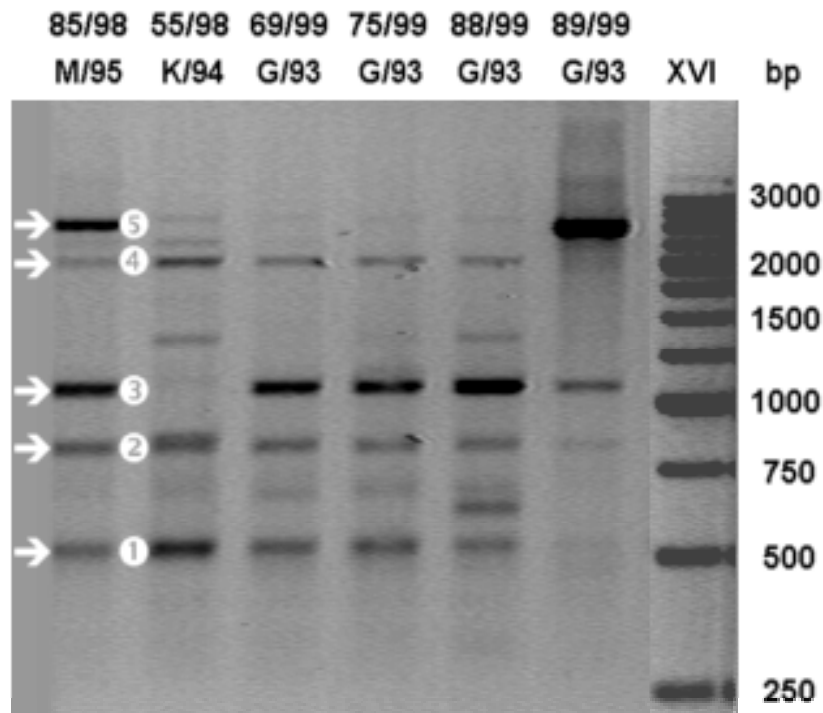


Abb. 4-23: PCR-Bandenmuster mit Primer STR-R15 – DNA einzelner *Striga hermonthica*-Pflanzen (Gelausschnitte). Gel mit Ethidiumbromid; Aufnahme unter UV-Licht; Bezeichnung oben: DNA-Probe; Kontr., Kontrolle; XVI, DNA-Molekulargewichtsmarker XVI; rechts: Größen der Markerbanden [bp]

#### 4.2.6.3.4 RAPD-PCR-Analysen

RAPD-PCR-Analysen wurden mit Gesamt-DNA-Proben von 168 einzelnen Genotypen durchgeführt. PCR-Durchläufe, deren Ergebnisse nicht eindeutig gewesen waren, z. B. solche, die in der Gelelektrophorese nur zu sehr schwachen Banden geführt hatten, wurden wiederholt. Konnte für eine bestimmte Genotyp-Primer-Kombination auch nach mehreren Wiederholungen kein eindeutiges Ergebnis erhalten werden, so der Fall für zwei Genotypen (K/94/22 und K/K/96/11), wurde dies in der Datenmatrix mit einem „-“ registriert. War für einen Genotyp die entsprechende Primerbande vorhanden, so wurde in der Matrix eine „1“ eingetragen, beim Fehlen der Bande dagegen eine „0“. Die gesamte Datenmatrix ist im Anhang (Kap. 7) dargestellt (Tab. 7-2 bis 7-7). Banden, die spezifisch für Genotypen einer bestimmten Herkunft waren, wurden nur in einem Fall gefunden: Die Bande 3 für den Primer STR-R13 (13/3) trat nur bei Genotypen der Herkunft Jemen, 1988 (Y/88) auf (Abb. 4-21).

#### 4.2.7 *Phylogenetische Auswertung*

Die mittels RAPD-PCR-Analysen gewonnene Datenmatrix wurde unter Anwendung verschiedener mathematischer Verfahren phylogenetisch ausgewertet. Dabei wurden die Daten sowohl für einzelne *Striga hermonthica*-Pflanzen als auch zusammengefaßt zu Populationen analysiert. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte jeweils in der übersichtlichen Form eines Stammbaums.

##### 4.2.7.1 Dendrogramme basierend auf Einzelproben

Es wurden Dendrogramme basierend auf den Daten der einzelnen Genotypen nach unterschiedlichen mathematischen Verfahren unter Verwendung des Computerprogramms *PAUP\** erstellt: Ein Dendrogramm wurde nach *UPGMA* (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*) erstellt (Abb. 4-24 und 4-25). Der erhaltene Baum wurde anschließend mittels *Bootstrap*-Analyse auf seine Güte hin überprüft. Es wurde eine 50%ige Konsensusbedingung eingestellt, und es wurden 100 Replikationen gerechnet. Die *Bootstrap*-Analyse zeigt die Gliederung in zwei große Zweige: Der eine Zweig mit einem *Bootstrap*-Wert von 85 umfaßt die Proben der Herkünfte aus Ghana (G), Mali (M), Niger (N) und Togo (To), der andere mit dem *Bootstrap*-Wert von 90 die Herkünfte aus Kenia (K), Sudan (S), Tansania (Ta) und Jemen (Y), jeweils mit den entsprechenden Untergruppierungen. Diese Aufgliederung kann als sehr sicher gelten, kamen doch HILLIS und BULL (1993) bei ihren Untersuchungen zum Schluß, daß man bei *Bootstrap*-Werte  $\geq 70$  davon ausgehen kann, daß mit einer Wahrscheinlichkeit  $\geq 95\%$  die richtigen phylogenetischen Verhältnisse gefunden worden sind. Innerhalb der zwei Hauptzweige sind nur nicht signifikante Aufspaltungen mit wesentlich niedrigeren *Bootstrap*-Werten (Werte zwischen 51 und 74) zu finden.

Das andere Dendrogramm wurde unter Verwendung von *Maximum Parsimony* (MP) erstellt. Aus den 2000 erhaltenen Bäumen wurde ein 50 %-Konsensusbaum ermittelt (Abb. 4-26 und 4-27). Die Zahlenwerte geben in Prozent an, in wie vielen der 2000 gerechneten Bäume die entsprechende Verzweigung vorlag. Die Aufspaltung in zwei Hauptzweige, die für *UPGMA* gefunden worden ist (s. o.), wird durch das Dendrogramm nach *MP* bestätigt. Die zwei Zweige wurden in allen 2000 gerechneten Bäumen (einhundert Prozent der Fälle) gefunden. Für die anderen Verzweigungen wurden Werte zwischen 50 % (untere Randbedingung) und 100 % ermittelt.

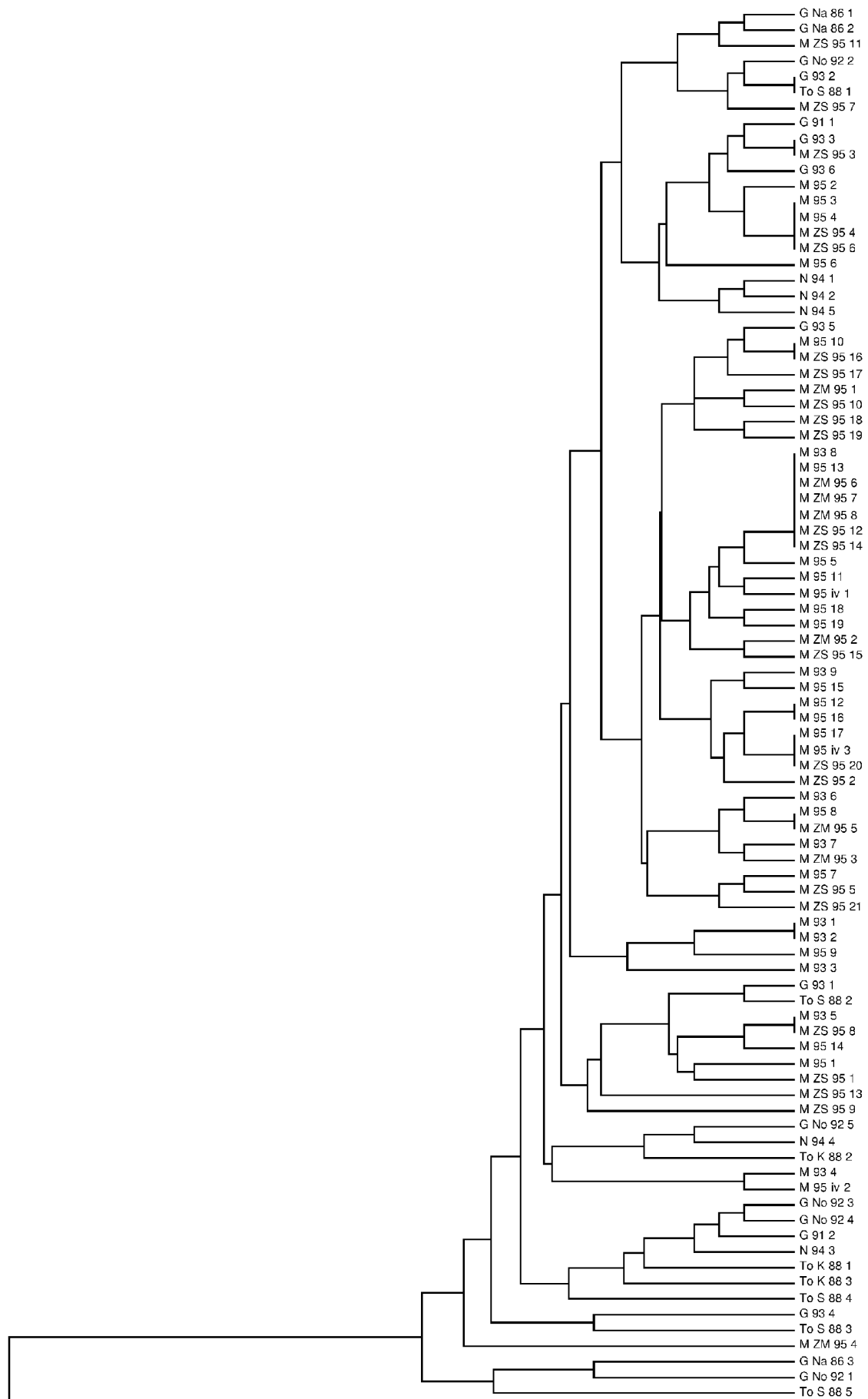
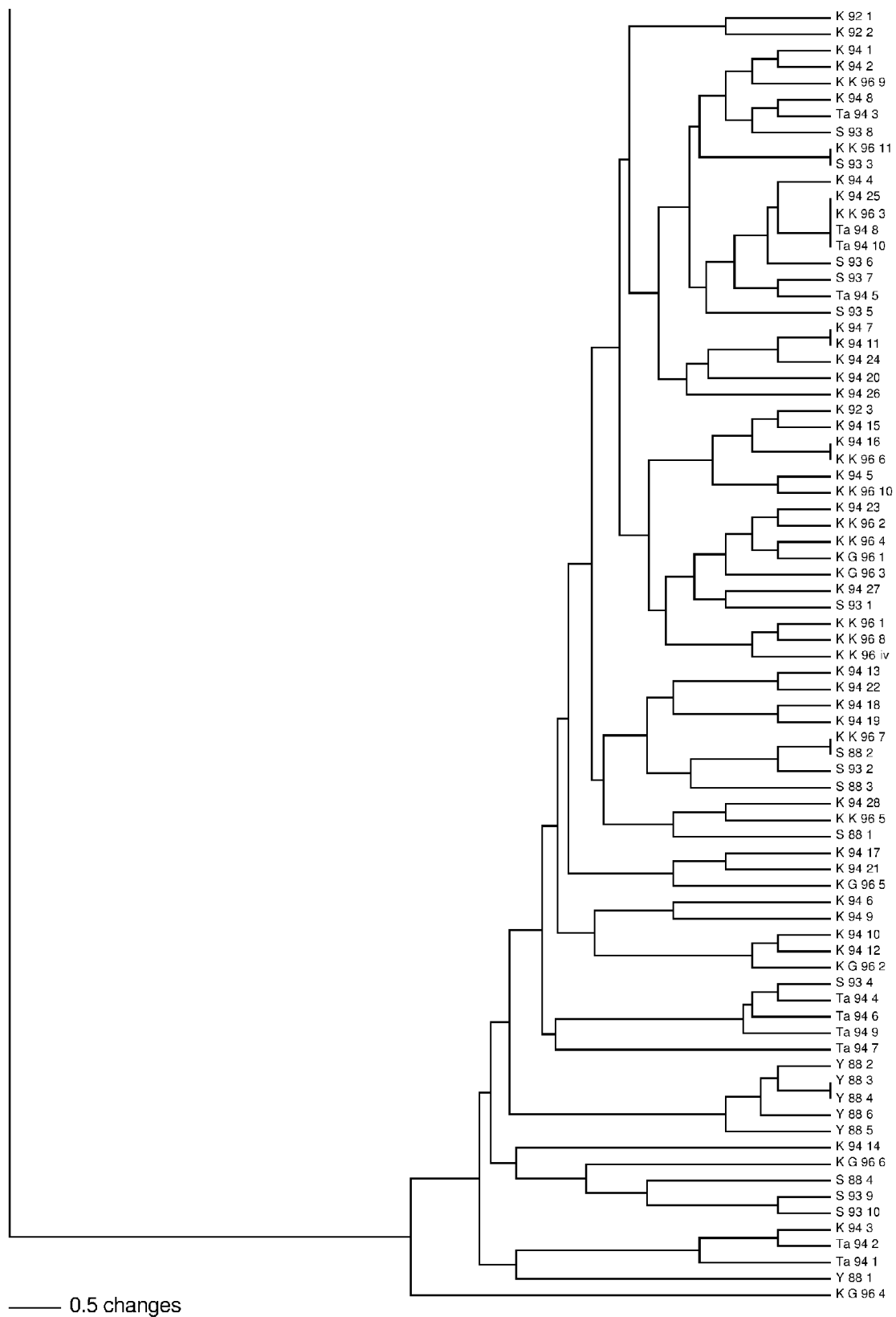


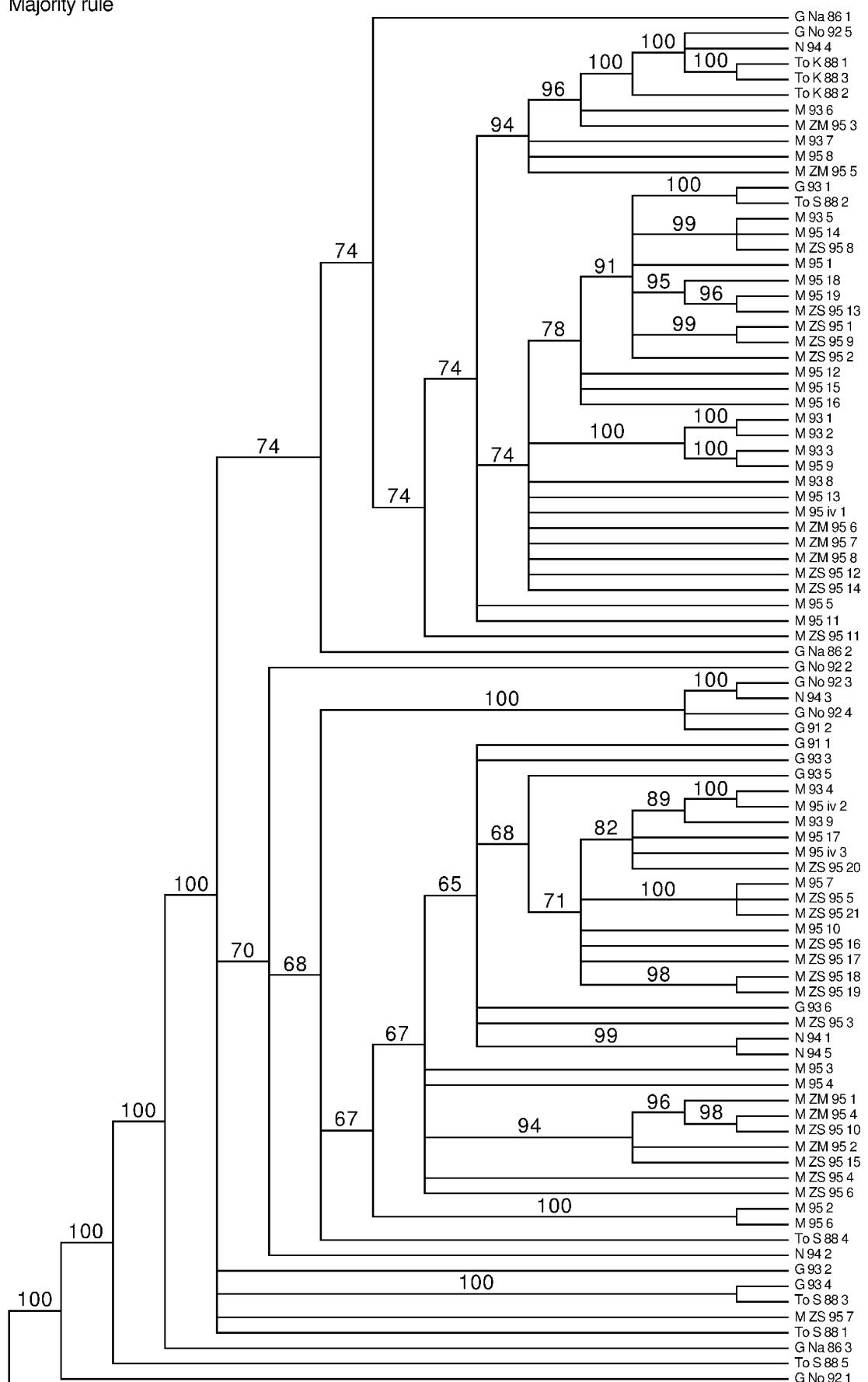
Abb. 4-24: Dendrogramm nach *UPGMA* (50 % Konsensus; 100 Replikationen) – Baumteil 1.



Abb. 4-25: Dendrogramm nach *UPGMA* (50 % Konsensus; 100 Replikationen) – Baumteil 2.

## Maximum Parsimony Consensus

Majority rule

Abb. 4-26: Dendrogramm nach *MP* (50%iger Konsensusbaum aus 2000 Bäumen) – Baumteil 1.



#### 4.2.7.2 Untersuchungen auf Populationsebene

Da sich in den vorangegangenen Untersuchungen zeigte, daß die einzelnen DNA-Proben gleicher Herkunft eine hohe Verwandtschaft zeigten, war es gerechtfertigt, sie für die weitere Auswertung zu Populationen zusammenzufassen. Die einzelne Kenia-Probe K/K/96/iv aus *In vitro*-Aufzucht wurde den Proben aus Gewächshaus-Aufzucht K/K/96 zugeordnet. Alle Untersuchungen auf Populationsebene wurden mit dem Computerprogramm *Popgene* durchgeführt.

##### 4.2.7.2.1 Gendiversität in den Populationen

Als Maß für die genetische Variabilität innerhalb der *Striga hermonthica*-Populationen wurde die Gendiversität  $h$  nach NEI (1973) bestimmt. Tab. 4-12 zeigt die Ergebnisse für die zwanzig Populationen der verschiedenen Herkünfte (Herkunftsbezeichnungen nach Tab. 4-9).

Tab. 4-12: Gendiversität  $h$  nach NEI (1973) von zwanzig *Striga hermonthica*-Populationen verschiedener Herkünfte ermittelt unter Verwendung des Computerprogramms *Popgene*.

| Population | Zahl untersuchter Pflanzen | $h$   |
|------------|----------------------------|-------|
| G/Na/86    | 3                          | 0,052 |
| G/No/92    | 2                          | 0,105 |
| G/91       | 5                          | 0,058 |
| G/93       | 6                          | 0,080 |
| K/92       | 3                          | 0,052 |
| K/94       | 28                         | 0,134 |
| K/K/96     | 12                         | 0,117 |
| K/G/96     | 6                          | 0,135 |
| M/93       | 9                          | 0,107 |
| M/95       | 19                         | 0,119 |
| M/95/iv    | 3                          | 0,063 |
| M/ZM/95    | 21                         | 0,114 |
| M/ZS/95    | 8                          | 0,116 |
| N/94       | 5                          | 0,061 |
| S/88       | 4                          | 0,122 |
| S/93       | 10                         | 0,138 |
| Ta/94      | 10                         | 0,114 |
| To/K/88    | 3                          | 0,089 |
| To/S/88    | 5                          | 0,170 |
| Y/88       | 6                          | 0,087 |

Die geringste Gendiversität wurde für die Populationen aus Naes/Ghana, 1986 (G/Na/86) und Kenia, 1992 (K/92) mit  $h = 0,052$  ermittelt. Die größte Gendiversität der untersuchten Populationen zeigte die Population aus der Savanne/Togo, 1988 (To/S/88) mit  $h = 0,170$ . Diese Werte sind für einen Fremdbefruchter vergleichsweise niedrig (SCHOEN UND BROWN 1991). Eine Tendenz zu höherer oder niedrigerer Gendiversität für bestimmte Regionen lag nicht vor. Auch konnte kein Zusammenhang zwischen der Größe einer Population (Zahl der untersuchten Individuen) und dem ermittelten Wert für die Gendiversität hergestellt werden. Beim Vergleich der Proben aus einem Land zeigte sich, daß bei der Mehrzahl der Proben die Gendiversität mit abnehmendem Alter der Samen (späteres Erntejahr) zunahm.

#### 4.2.7.2.2 Genetische Distanz und genetische Identität

Die genetische Distanz (GD) zwischen den verschiedenen *Striga hermonthica*-Populationen sowie deren genetische Identität (GI) wurden nach dem Verfahren ohne zusätzliche Randbedingungen (engl. *unbiased*) nach NEI (1978) berechnet. Die Ergebnisse sind in Tab. 4-13 zusammengefaßt. Die Werte lassen sich in zwei Klassen einteilen: Werte für die GD von 0,009–0,164 (GI = 0,991–0,849) drücken einen hohen Verwandtschaftsgrad der Populationen zueinander aus. Dagegen sind Populationen mit GD = 0,283–0,552 (GI = 0,754–0,576) nur wenig miteinander verwandt. Einen hohen Verwandtschaftsgrad zueinander zeigten jeweils die Populationen der Herkünfte aus Ghana (G), Mali (M), Niger (N) und Togo (To) auf der einen Seite und die aus Kenia (K), Sudan (S), Tansania (Ta) und Jemen (Y) auf der anderen. Umgekehrt zeigten Populationen aus der ersten Gruppe nur eine geringe Verwandtschaft zu Populationen aus der zweiten Gruppe.

#### 4.2.7.2.3 Dendrogramm basierend auf den Populationsdaten

Basierend auf den ermittelten genetischen Distanzen nach NEI (1978) (Kap. 4.2.7.2.2) wurde mit dem Verfahren nach UPGMA ein Dendrogramm erstellt, das die Verwandtschaftsverhältnisse der *S. hermonthica*-Populationen zueinander darstellt (Abb. 4-28). Dieses Dendrogramm zeigt eine deutliche Aufspaltung in zwei Gruppen: Die eine Gruppe mit einem Distanzwert von 19,055 umfaßt, wie bereits für die auf Einzelproben basierenden Dendrogramme beschrieben (Kap. 4.2.7.1), die Populationen aus Ghana, Mali, Niger und Togo. Die andere Gruppe mit dem Distanzwert 17,438 beinhaltet Populationen aus Kenia, Sudan, Tansania und Jemen. Die genetischen Distanzen innerhalb der zwei Hauptgruppen lassen keine weitere Struktur der Verwandtschaftsverhältnisse erkennen.

Tab. 4-13: Genetische Distanz und genetische Identität ohne zusätzliche Randbedingungen (*unbiased*) nach Nei (1978)  
von zwanzig *Striga hermonthica*-Populationen verschiedener Herkunftse ermittelte unter Verwendung des Programms *Popgene*.

| Pop     | M/ M/ M/ |         |       |       |       |       |        |        |       |       |       |       |       |       |       |       |       |         |         |       |
|---------|----------|---------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|---------|-------|
|         | G/Na/86  | G/No/92 | G/91  | G/93  | K/92  | K/94  | K/K/96 | K/G/96 | M/93  | M/95  | 95/iv | ZM/95 | ZS/95 | N/94  | S/88  | S/93  | Ta/94 | To/K/88 | To/S/88 | Y/88  |
| G/Na/86 | ****     | 0.030   | 0.070 | 0.040 | 0.475 | 0.486 | 0.453  | 0.532  | 0.103 | 0.066 | 0.104 | 0.092 | 0.060 | 0.079 | 0.368 | 0.447 | 0.458 | 0.048   | 0.040   | 0.521 |
| G/No/92 | 0.970    | ****    | 0.040 | 0.062 | 0.374 | 0.391 | 0.346  | 0.425  | 0.085 | 0.056 | 0.074 | 0.085 | 0.068 | 0.044 | 0.283 | 0.349 | 0.350 | 0.032   | 0.035   | 0.415 |
| G/91    | 0.932    | 0.961   | ****  | 0.058 | 0.425 | 0.483 | 0.425  | 0.524  | 0.105 | 0.065 | 0.116 | 0.095 | 0.066 | 0.042 | 0.382 | 0.431 | 0.433 | 0.038   | 0.072   | 0.526 |
| G/93    | 0.961    | 0.940   | 0.944 | ****  | 0.469 | 0.490 | 0.466  | 0.524  | 0.066 | 0.027 | 0.081 | 0.063 | 0.022 | 0.057 | 0.380 | 0.443 | 0.464 | 0.039   | 0.045   | 0.514 |
| K/92    | 0.622    | 0.688   | 0.654 | 0.626 | ****  | 0.048 | 0.036  | 0.060  | 0.516 | 0.531 | 0.552 | 0.515 | 0.498 | 0.487 | 0.091 | 0.039 | 0.048 | 0.477   | 0.336   | 0.164 |
| K/94    | 0.615    | 0.677   | 0.617 | 0.612 | 0.953 | ****  | 0.011  | 0.010  | 0.468 | 0.497 | 0.528 | 0.489 | 0.497 | 0.525 | 0.046 | 0.013 | 0.022 | 0.467   | 0.346   | 0.086 |
| K/K/96  | 0.636    | 0.708   | 0.654 | 0.627 | 0.965 | 0.989 | ****   | 0.027  | 0.458 | 0.472 | 0.482 | 0.464 | 0.471 | 0.462 | 0.039 | 0.020 | 0.022 | 0.427   | 0.327   | 0.100 |
| K/G/96  | 0.587    | 0.654   | 0.592 | 0.592 | 0.942 | 0.990 | 0.973  | ****   | 0.488 | 0.527 | 0.520 | 0.508 | 0.529 | 0.547 | 0.060 | 0.030 | 0.052 | 0.499   | 0.392   | 0.103 |
| M/93    | 0.902    | 0.918   | 0.900 | 0.937 | 0.597 | 0.627 | 0.633  | 0.614  | ****  | 0.028 | 0.028 | 0.011 | 0.037 | 0.098 | 0.397 | 0.440 | 0.451 | 0.066   | 0.089   | 0.480 |
| M/95    | 0.936    | 0.946   | 0.937 | 0.974 | 0.588 | 0.608 | 0.624  | 0.591  | 0.973 | ****  | 0.037 | 0.026 | 0.009 | 0.064 | 0.380 | 0.457 | 0.464 | 0.036   | 0.054   | 0.494 |
| M/95/iv | 0.901    | 0.929   | 0.890 | 0.922 | 0.576 | 0.590 | 0.617  | 0.595  | 0.973 | 0.964 | ****  | 0.026 | 0.048 | 0.076 | 0.384 | 0.483 | 0.502 | 0.067   | 0.100   | 0.521 |
| M/ZM/95 | 0.912    | 0.919   | 0.910 | 0.939 | 0.598 | 0.613 | 0.629  | 0.602  | 0.989 | 0.974 | 0.974 | ****  | 0.022 | 0.096 | 0.408 | 0.456 | 0.480 | 0.057   | 0.077   | 0.485 |
| M/ZS/95 | 0.942    | 0.934   | 0.936 | 0.978 | 0.608 | 0.609 | 0.624  | 0.589  | 0.963 | 0.991 | 0.954 | 0.978 | ****  | 0.070 | 0.379 | 0.451 | 0.487 | 0.034   | 0.045   | 0.515 |
| N/94    | 0.924    | 0.957   | 0.959 | 0.944 | 0.614 | 0.591 | 0.630  | 0.579  | 0.906 | 0.938 | 0.926 | 0.909 | 0.933 | ****  | 0.403 | 0.491 | 0.496 | 0.014   | 0.074   | 0.584 |
| S/88    | 0.692    | 0.754   | 0.683 | 0.684 | 0.913 | 0.955 | 0.962  | 0.942  | 0.673 | 0.684 | 0.681 | 0.665 | 0.684 | 0.668 | ****  | 0.038 | 0.077 | 0.348   | 0.260   | 0.085 |
| S/93    | 0.640    | 0.705   | 0.650 | 0.642 | 0.962 | 0.987 | 0.980  | 0.971  | 0.644 | 0.633 | 0.617 | 0.634 | 0.637 | 0.612 | 0.963 | ****  | 0.020 | 0.440   | 0.315   | 0.084 |
| Ta/94   | 0.633    | 0.705   | 0.649 | 0.629 | 0.953 | 0.978 | 0.979  | 0.950  | 0.637 | 0.629 | 0.605 | 0.619 | 0.615 | 0.609 | 0.926 | 0.981 | ****  | 0.462   | 0.333   | 0.105 |
| To/K/88 | 0.954    | 0.969   | 0.962 | 0.962 | 0.621 | 0.627 | 0.653  | 0.607  | 0.936 | 0.964 | 0.935 | 0.944 | 0.966 | 0.987 | 0.707 | 0.644 | 0.630 | ****    | 0.039   | 0.494 |
| To/S/88 | 0.961    | 0.966   | 0.931 | 0.956 | 0.715 | 0.708 | 0.721  | 0.676  | 0.915 | 0.948 | 0.905 | 0.926 | 0.956 | 0.930 | 0.771 | 0.730 | 0.717 | 0.962   | ****    | 0.354 |
| Y/88    | 0.594    | 0.660   | 0.591 | 0.598 | 0.849 | 0.918 | 0.905  | 0.902  | 0.619 | 0.610 | 0.594 | 0.616 | 0.598 | 0.558 | 0.919 | 0.919 | 0.900 | 0.610   | 0.702   | ****  |

Genetische Distanz (oberhalb der Diagonale) und genetische Identität (unterhalb der Diagonale)

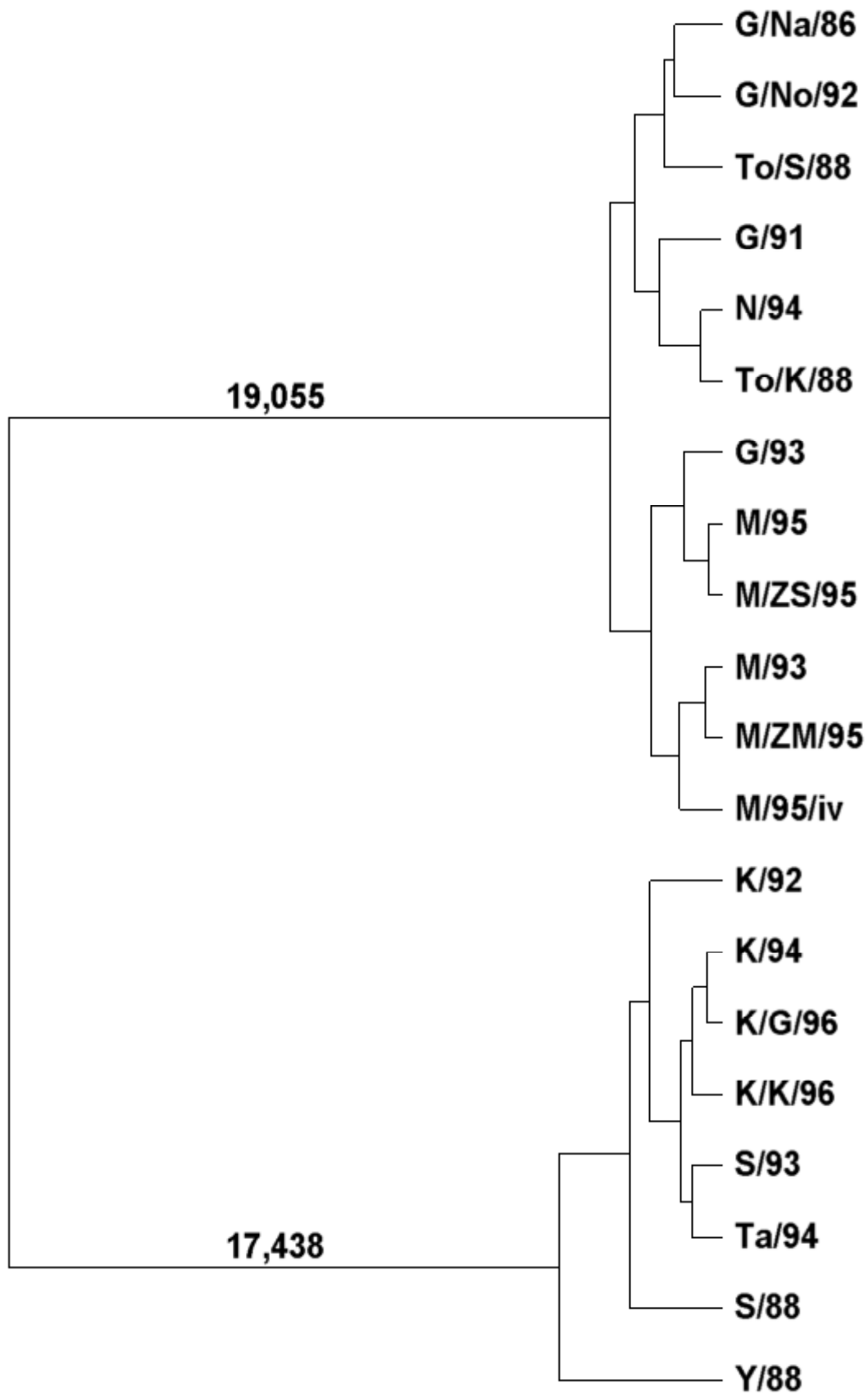


Abb. 4-28: Dendrogramm von zwanzig *Striga hermonthica*-Populationen verschiedener Herkunft basierend auf der genetischen Distanz (NEI 1978) – Methode *UPGMA*. Programm *Popgene*, modifizierte Routine *Neighbor* aus *Phylip* Version 3.5 (© 1986–93 by Joseph Felsenstein, Dept. of Genetics SK-50, University of Washington, Seattle, WA, USA)

### 4.3 Interaktion Wirt – Parasit *Striga hermonthica*

#### 4.3.1 Identifizierung keimungsinduzierender Stoffe in Sorghum- und Millet-Wurzelexsudaten

##### 4.3.1.1 Keimungstests mit Sorghum- und Millet-Wurzelexsudaten

Die Keimung von *Striga hermonthica*-Samen konnte mit einzelnen Wurzelexsudaten, unbehandelte Rohexsudate, aller in dieser Arbeit untersuchten Sorghum- und Millet-Varietäten in Petrischalenkeimungstests induziert werden. Somit waren alle Varietäten, ob als suszeptibel oder als resistent eingestuft, in der Lage, keimungsinduzierende Stoffe zu produzieren. Die Keimungsraten waren dabei z. T. sehr gering, sie lagen meist zwischen 0,3 und 4 %. In Einzelfällen wurde eine Keimungsrate bis zu 20 % erzielt (einzelne Probe der Sorghum-Varietät CSM-209). Varietäten, die als *low stimulant* in der Literatur beschrieben wurden, wie z. B. 555 (2 % Keimungsrate im Versuch), Framida (3 %), IS-9830 (7 %), zeichneten sich in den Experimenten nicht durch eine besonders geringe Keimungsrate aus. Und nicht jede Wurzelexsudatprobe der verschiedenen Varietäten induzierte die Keimung der *S. hermonthica*-Samen der Herkünfte Mali 95 (M/95) und Kenia 94 (K/94) gleichermaßen.

##### 4.3.1.2 Konzentrierung keimungsinduzierender Stoffe

Die in den Sorghum-Wurzelexsudaten vorhandene Menge an Keimungsstimulantien erwies sich in den Keimungstests als sehr gering (s. o.). Deshalb wurde versucht, die Keimungsstimulantien in den Proben zu konzentrieren. Als Verfahren wurden das Lyophilisieren sowie das Konzentrieren über Kieselgel (Blaugel) getestet. Für das Verfahren des Lyophilisierens wurden zuerst Tests mit dem Keimungsstimulans GR 24 durchgeführt (Abb. 4-29). Verwendet wurden sowohl Kunststoff- als auch Glasgefäße. Als Maß für die Konzentration wurde die Fähigkeit zur Keimungsinduktion von *Striga hermonthica*-Samen herangezogen. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden die Proben lyophilisiert und anschließend in H<sub>2</sub>O bidest. mit dem Ausgangsvolumen wieder aufgenommen (Anreicherung Faktor 1). Die Wiederfindungsrate lag bei gut 100 %, es wurde in etwa die gleiche Keimungsrate wie bei den unbehandelten Proben erzielt, jeweils rund 40 %. Der Anreicherungsversuch um (rechnerisch) Faktor 10 (im 10tel Volumen der Ausgangsmenge aufgenommen) ergab eine Steigerung der Keimungsrate auf 55 %. Bei (rechnerisch) Faktor 50 (50stel Volumen) wurde keine weitere Steigerung der Keimungsrate erzielt. Das Lyophilisieren von Wurzelexsudatproben der Sorghum-Varietäten 555, Framida, IS-9830, M-35-1, DS-1195, CSM-209 und CSM-335 sowie der Millet-Varietäten Boboni und Soxsat



führte zum Verlust der Fähigkeit zur Keimungsinduktion von *Striga*-Samen.

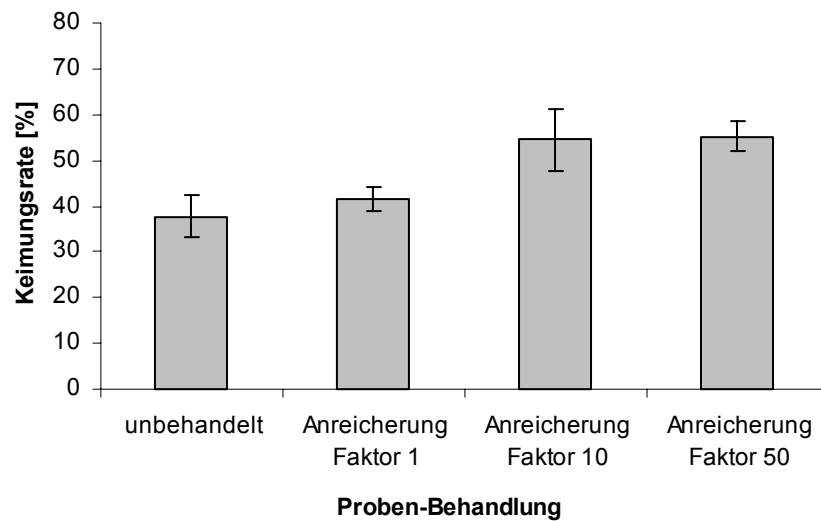


Abb. 4-29: Konzentrierung von keimungsinduzierenden Lösungen durch Lyophilisieren am Beispiel des Keimungsstimulans GR 24. Lösung 3 ppm, unbehandelt und (rechnerisch) angereichert um Faktor 1, 10 und 50; im Keimungstest jeweils 20 µl bei 2 ml Gesamtvolumen; Keimungstests mit acht Tage konditionierten *Striga hermonthica*-Samen der Herkunft Mali 95 (M/95); Keimungsrate [%] und Standardfehler; drei Experimente mit jeweils drei Parallelen

Bei den Versuchen mit Blaugel als Trocknungsmittel wurden innerhalb von zwei Wochen die Volumina der Exsudate und Lösungen auf 2–5 % des Ausgangsvolumens reduziert (Versuche in Glasgefäßen). Die konzentrierten Proben des Keimungsstimulans GR 24 zeigten eine Keimungsrate von 40–50 %. Damit lagen die Werte auf dem gleichen Niveau wie beim Versuch des Lyophilisierens. Die Proben der Wurzelexsudate der Millet-Varietäten Boboni (Keimungsrate 0,5 %) und Soxsat (7 %) sowie der Sorghum-Varietäten CSM-209 (1 %) und Toroniu (1,2 %) lagen auf dem Niveau der Rohexsudate. Die Proben der Wurzelexsudate der Sorghum-Varietäten Framida, IS-9830, M-35-1, DS-1195 und CSM-335 zeigten nach dem Konzentrieren keine keimungsinduzierende Wirkung mehr.

### 4.3.1.3 Dünnschichtchromatographie

#### Registrierung von Substanzflecken

Proben des Keimungsstimulans GR 24 sowie Sorghum- und Millet-Wurzelexsudate wurden mittels Dünnschichtchromatographie (DC) aufgetrennt. Als am besten zur Auftrennung geeignet, erwies sich das Laufmittel 4 bestehend aus 2-Butanol:Ethanol:H<sub>2</sub>O bidest. 4:4:2 (v/v/v). Nach dem DC-Lauf wurden die DC-Platten visuell bei Tageslicht und unter UV-Licht untersucht. Darüber hinaus wurden verschiedene Bedampfungsverfahren sowie Farbreagentien zur Sichtbarmachung eingesetzt. Nur Proben des Keimungsstimulans GR 24 konnten visuell nachgewiesen werden. GR 24 lag in der Probe als Racemat aus vier Stereoisomeren vor. Unter UV-Licht bei  $\lambda = 254$  nm ließen sich zwei Substanzflecken als Fluoreszenzlöschung des Indikators der stationären Phase mit den R<sub>F</sub>-Werten 0,66 und 0,75 in den Chromatogrammen beobachten (Tab. 4-14). Die Detektion war allerdings auch hier nur bei den hohen Konzentration ab 3 ppm Keimungsstimulans GR 24 möglich.

Tab. 4-14: Identifizierung von Keimungsstimulantien mittels Dünnschichtchromatographie – Fluoreszenzlöschung des Indikators der stationären Phase unter UV-Licht bei  $\lambda = 254$  nm. Proben: Keimungsstimulans GR 24 (jeweils 10  $\mu$ l); DC-Platten: DC-Alufolien, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Schichtdicke 0,2 mm; mobile Phase: 2-Butanol: Ethanol:H<sub>2</sub>O bidest. 4:4:2 (v/v/v) (Laufmittel 4); R<sub>F</sub>-Werte der detektierten Banden

| DC-Läufe /<br>Probe | R <sub>F</sub> -Wert |         |
|---------------------|----------------------|---------|
|                     | Bande 1              | Bande 2 |
| GR 24 (300 ppm)     | 0,66                 | 0,75    |
| GR 24 (3 ppm)       | 0,66                 | 0,75    |
| GR 24 (3 ppm)       | 0,66                 | 0,75    |

Stoffe aus den Proben aller untersuchten Wurzelexsudate konnten dagegen nicht auf den DC-Platten nachgewiesen werden. Unter sichtbarem und unter UV-Licht konnten keine Banden detektiert werden. Die getesteten Verfahren zur Sichtbarmachung (Anfärbung und Bedampfung) führten zu keiner Farbreaktion.

#### 4.3.1.4 Bioautographie mit *Striga hermonthica*-Samen

##### 4.3.1.4.1 Test auf Verbreiterung

Die Keimung von *Striga hermonthica*-Samen war nur in einer feuchten Umgebung möglich, wie die Petrischalenkeimungstests zeigten. Wollte man die Keimung von Samen durch Stimulantien auf einer DC-Platte induzieren, so mußte ein feuchtes Milieu geschaffen werden. Dies konnte mithilfe des Überschichtens mit Wasseragar geschehen. Im Vorversuch wurde geklärt, ob es durch das Auftragen des Wasseragars und die Feuchte zu einer Verbreiterung bzw. Wanderung der keimungsstimulierenden Stoffe auf der DC-Platte kommt. Zuerst wurden acht Tage konditionierte *S. hermonthica*-Samen der Herkunft Mali 95 (M/95) möglichst gleichmäßig auf die DC-Platte aufgebracht. Zur Keimungsinduktion wurde das Keimungsstimulans GR 24 eingesetzt, welches punktförmig in die Mitte der DC-Platte appliziert wurde. Es fand keine dünnschichtchromatographische Auftrennung statt. Danach wurde die DC-Platte mit Wasseragar überschichtet und im Dunkeln inkubiert. Nach einer Woche wurden die Positionen der gekeimten Samen ermittelt. Der Abstand auf der DC-Platte zwischen der Auftragsstelle des Keimungsstimulans GR 24 (15 µl 0,03 ppm) und den am weitest-entfernt gekeimten *Striga*-Samen betrug 4 cm (Abb. 4-30). Die Keimungsrate auf der DC-Platte selbst in der Nähe der Auftragsstelle (Radius 2 cm) war mit 2–4 % sehr gering.

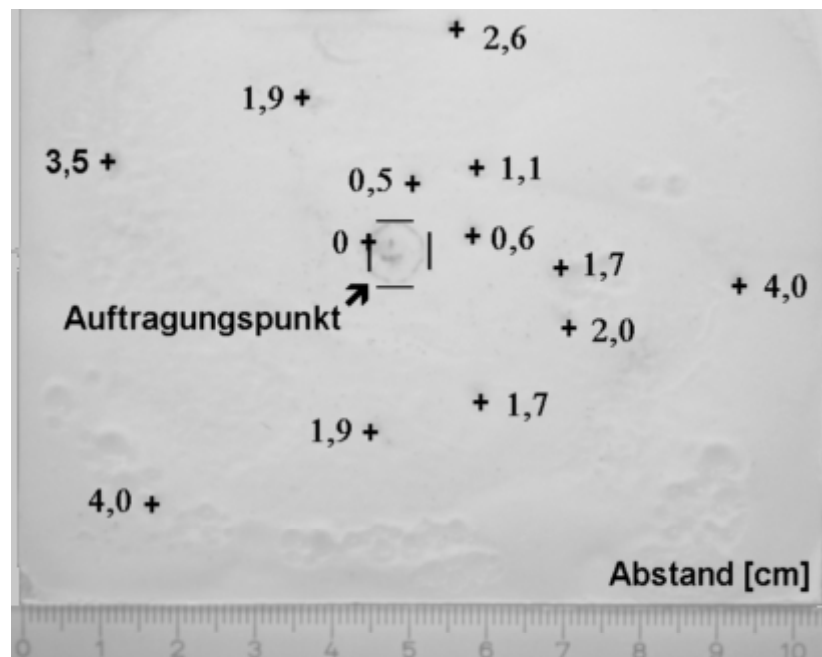


Abb. 4-30: Keimungstest auf DC-Platte – Verbreiterung. Keimung von *Striga hermonthica*-Samen in Abstand von der Auftragung des Keimungsstimulans GR 24 (15 µl 0,03 ppm); +, markieren gekeimte Samen; Zahlenangaben, Abstand [cm]; DC-Platte: DC-Alufolie, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Schichtdicke 0,2 mm; DC-Platte überschichtet mit 0,7%igem Wasseragar, ca. 300 Samen aus Mali 95 (M/95) gleichmäßig verteilt, acht Tage konditioniert

Somit handelte es sich bei den gekeimten Samen um rein qualitative Ereignisse. Die Keimung wurde aber mit hoher Wahrscheinlichkeit durch das aufgebraachte Stimulans induziert, da eine Spontankeimung, d. h. eine Keimung ohne Induktor, in keinem einzigen Versuch im Rahmen dieser Arbeit aufgetreten war.

#### 4.3.1.4.2 DC-Biotest

Das Keimungsstimulans GR 24 und die Wurzelexsudate verschiedener Sorghum- und Millet-Varietäten wurden im DC-Biotest untersucht. Wurzelexsudate, die im Vortest auf Keimungsinduktion ein positives Ergebnis zeigten, induzierten im DC-Biotest nicht unbedingt die Keimung. Generell waren die Keimungsraten im DC-Biotest (bei Wurzelexsudaten) äußerst gering. Eine Erhöhung der Substanzmenge auf der Platte um den Faktor 25 durch wiederholtes Auftüpfeln (anfangs 10 µl, später bis 250 µl Gesamtvolumen) führte nicht zu wesentlich höheren Keimungsraten. Eine weitere Steigerung der Substanzmenge scheiterte an der Limitierung durch die technischen Eigenschaften der DC-Platte: weiteres Auftüpfeln war ohne Beschädigung der Kieselgeloberfläche nicht möglich. Die Abb. 4-31 verdeutlicht am Beispiel des Keimungsstimulans GR 24 die Verhältnisse im Chromatogramm schematisch: Dargestellt ist die Auftragungsstelle der Probe, die Lage der Front sowie die Keimungsrate der *S. hermonthica*-Samen im Biotest in Abhängigkeit vom  $R_f$ -Wert. Zu beachten ist hierbei, daß der angegebene  $R_f$ -Wert der Laufstrecke bis zur Mitte eines der 1 cm breiten DC-Teststreifen entspricht. Die Tab. 4-15 bis 4-19 zeigen die Ergebnisse aller Experimente unter Verwendung des DC-Biotests: Die Keimungsraten sind in Abhängigkeit vom  $R_f$ -Wert für die untersuchten GR 24-Lösungen und Exsudate der Sorghum- und Millet-Varietäten dargestellt. Als Laufmittel wurde 2-Butanol:Ethanol:H<sub>2</sub>O bidest. 4:4:2 (v/v/v) (Laufmittel 4) verwendet. Diese Zusammensetzung führte in Vorversuchen mit GR 24 zu guten Trennergebnissen. In allen DC-Biotests wurden die DC-Abschnitte mit 0,7%igem Wasseragar überschichtet, als Bioindikatoren wurden acht Tage konditionierte *S. hermonthica*-Samen der Herkunft Mali 95 (M/95) eingesetzt. Für das Keimungsstimulans GR 24 wurden unter den ausgewählten Chromatographiebedingungen die maximalen Keimungsraten in der Mehrzahl der Experimente bei einem  $R_f$ -Wert von 0,76 registriert. In einigen wenigen Fällen befand sich die Position, an der die maximale Keimungsrate auftrat, bei  $R_f = 0,65$ . Mit Maximalwerten von 15–50 % erreichte die Keimungsrate ein für Biotests vergleichsweise hohes Niveau. Bei der Induktion durch Wurzelexsudate von Sorghum- und Millet-Pflanzen ergaben sich wesentlich geringere Keimungsraten: Die höchste, mit knapp 8 %, wurde bei einer Probe der Millet-Varietät Soxsat ermittelt.

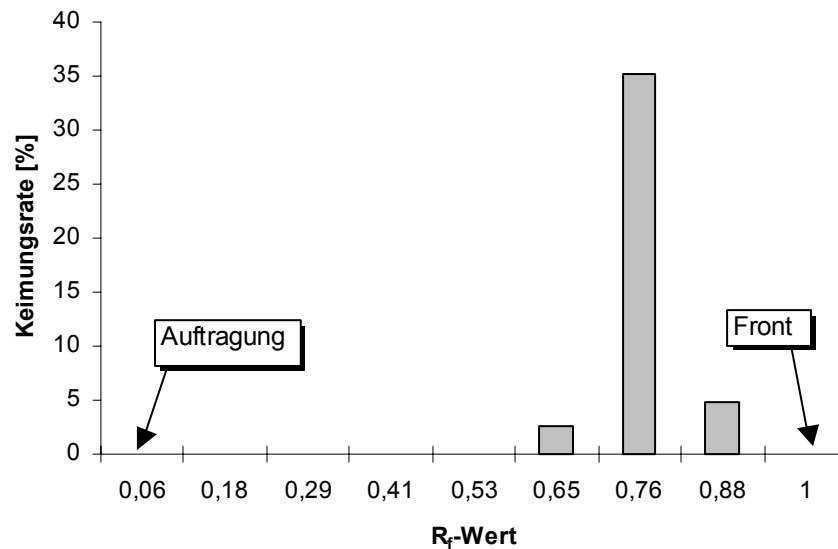


Abb. 4-31: Nachweis von Keimungsstimulantien – Dünnschichtchromatographische Trennung mit anschließendem Biotest. Probe: Keimungsstimulans GR 24 (aufgetragen: 20 µl 3 ppm); Keimungsrate [%] von *Striga hermonthica*-Samen in Abhängigkeit vom R<sub>F</sub>-Wert im Chromatogramm; DC-Platte: DC-Alufolie, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Schichtdicke 0,2 mm; mobile Phase: 2-Butanol:Ethanol:H<sub>2</sub>O bidest. 4:4:2 (v/v/v) (Laufmittel 4); Biotest: DC-Streifen, pro Streifen ca. 200–400 *S. hermonthica*-Samen aus Mali 95 (M/95), acht Tage konditioniert, überschichtet mit 0,7%igem Wasseragar

Die Exsudate von Soxsat zeigten Keimung in den Abschnitten mit einem R<sub>F</sub>-Wert von 0,76. In einem Experiment lag die Keimungszone bei R<sub>F</sub> = 1,00, also im Bereich der Laufmittelfront. Bei den Sorghum-Varietäten DS-1195 und N-13 betrugen die R<sub>F</sub>-Werte der Keimungszonen ebenfalls 0,76. Exsudate von CSM-209 zeigten Keimung bei R<sub>F</sub> = 0,88. In einem Experiment wurde die Keimung auch im Bereich der Auftragsstelle induziert. Die Millet-Varietät Boboni zeigte eine Keimungsinduktion bei einem R<sub>F</sub>-Wert von 0,53. Für die Varietäten Seredo, IS-1037 und 555 bot sich ein unklares Bild: In verschiedenen Experimenten wurde Keimung in unterschiedlichen Abschnitten der DC-Platte induziert. Für Exsudate der Sorghum-Varietäten Framida, IS-9830, E-36-1, M-35-1 und CSM-335 konnte eine Keimungsinduktion auf den DC-Streifen nicht (zuverlässig) nachgewiesen werden.

Auf den folgenden Seiten Tab. 4-15 bis 4-19:

Identifizierung von Keimungsstimulantien – Dünnschichtchromatographische Trennung mit anschließendem Biotest. Keimungsrate [%] von *Striga hermonthica*-Samen in Abhängigkeit vom R<sub>F</sub>-Wert im Chromatogramm, höchste Keimungsrate jeweils grau hinterlegt.

Versuchsbedingungen: DC-Platten: DC-Alufolien, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Schichtdicke 0,2 mm; mobile Phase: 2-Butanol:Ethanol:H<sub>2</sub>O bidest. 4:4:2 (v/v/v) (Laufmittel 4);

Probenvolumen: 200–250 µl, für GR 24 Volumen und Konzentration abhängig vom Experiment:

1) 10 µl 3 ppm, 2) 10 µl 300 ppm, 3) 10 µl 3 ppm, 4) 10 µl 3 ppm, 5) 20 µl 3 ppm, 6) 20 µl 3 ppm, 7) 20 µl 3 ppm, 8) 20 µl 3 ppm, 9) 20 µl 3 ppm, 10) 20 µl 3 ppm, 11) 20 µl 3 ppm;

Biotest: DC-Streifen, pro Streifen ca. 200–400 *S. hermonthica*-Samen aus Mali 95 (M/95), acht Tage konditioniert, überschichtet mit 0,7%igem Wasseragar

Tab. 4-15: Identifizierung von Keimungsstimulanten im DC-Biotest – Keimungsstimulans GR 24 und Millet-Wurzelexudate.

| GR 24          |        | Keimungsrate [%] |        |        |        |        |        |        |        |         |         |
|----------------|--------|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|
| R <sub>i</sub> | Exp. 1 | Exp. 2           | Exp. 3 | Exp. 4 | Exp. 5 | Exp. 6 | Exp. 7 | Exp. 8 | Exp. 9 | Exp. 10 | Exp. 11 |
| 0,06           | 0,6    | 13,1             | 0,2    | 0      | 0,3    | 0      | 0      | 0      | 0      | 0       | 0       |
| 0,18           | 0      | 4,8              | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0       | 0       |
| 0,29           | 0,6    | 0                | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0       | 0       |
| 0,41           | 0,4    | 7,5              | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0       | 0       |
| 0,53           | 0,4    | 18,7             | 1,4    | 0,2    | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0       | 0       |
| 0,65           | 29,4   | 15,1             | 21     | 1,8    | 0      | 1,7    | 0      | 2,6    | 0      | 33,6    | 7,8     |
| 0,76           | 15,7   | 31,9             | 11,3   | 15,4   | 25,3   | 47,8   | 17,5   | 35,1   | 50     | 1       | 38,9    |
| 0,88           | 0,6    | 1,5              | 0      | 0      | 8,5    | 4,4    | 11,9   | 4,9    | 0,6    | 0       | 0       |
| 1,00           | 0      | 2,2              | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0       | 0       |

| Soxsat         |        | Keimungsrate [%] |        |        |  |
|----------------|--------|------------------|--------|--------|--|
| R <sub>i</sub> | Exp. 1 | Exp. 2           | Exp. 3 | Exp. 4 |  |
| 0,06           | 0      | 0                | 0      | 0      |  |
| 0,18           | 0      | 0                | 0      | 0      |  |
| 0,29           | 0      | 0                | 0      | 0      |  |
| 0,41           | 0      | 0                | 0      | 0      |  |
| 0,53           | 0      | 0                | 0      | 0      |  |
| 0,65           | 0      | 0                | 0      | 0      |  |
| 0,76           | 0,8    | 0,9              | 0      | 0,4    |  |
| 0,88           | 0      | 0                | 0      | 0      |  |
| 1,00           | 0      | 0                | 7,8    | 0      |  |

| Boboni         |        | Keimungsrate [%] |  |
|----------------|--------|------------------|--|
| R <sub>i</sub> | Exp. 1 | Exp. 2           |  |
| 0,06           | 0      | 0                |  |
| 0,18           | 0      | 0                |  |
| 0,29           | 0      | 0                |  |
| 0,41           | 0      | 0                |  |
| 0,53           | 0,5    | 0                |  |
| 0,65           | 0      | 0                |  |
| 0,76           | 0      | 0                |  |
| 0,88           | 0      | 0                |  |
| 1,00           | 0      | 0                |  |

Tab. 4-16: Identifizierung von Keimungsstimulanzien im DC-Biotest – Sorghum-Wurzelexsudate.

|         |                |                  |        |        |        |        |        |        |        |
|---------|----------------|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| N-13    | R <sub>f</sub> | Keimungsrate [%] |        |        |        |        |        |        |        |
|         |                | Exp. 1           | Exp. 2 |        |        |        |        |        |        |
|         | 0,06           | 0                | 0      |        |        |        |        |        |        |
|         | 0,18           | 0                | 0      |        |        |        |        |        |        |
|         | 0,29           | 0                | 0      |        |        |        |        |        |        |
|         | 0,41           | 0                | 0      |        |        |        |        |        |        |
|         | 0,53           | 0                | 0      |        |        |        |        |        |        |
|         | 0,65           | 0                | 0      |        |        |        |        |        |        |
|         | 0,76           | 0,4              | 1      |        |        |        |        |        |        |
|         | 0,88           | 0                | 0      |        |        |        |        |        |        |
|         |                | (0,4)            | 0      |        |        |        |        |        |        |
|         |                | 1,00             | 0      |        |        |        |        |        |        |
| 555     | R <sub>f</sub> | Keimungsrate [%] |        |        |        |        |        |        |        |
|         |                | Exp. 1           | Exp. 2 | Exp. 3 |        |        |        |        |        |
|         | 0,06           | 0                | 0      | 0      |        |        |        |        |        |
|         | 0,18           | 0                | 0      | 0      |        |        |        |        |        |
|         | 0,29           | 0                | 0,3    | 0      |        |        |        |        |        |
|         | 0,41           | 0                | 0      | 0      |        |        |        |        |        |
|         | 0,53           | 0                | 0      | 0      |        |        |        |        |        |
|         | 0,65           | 0,3              | 0      | 0      |        |        |        |        |        |
|         | 0,76           | 0                | 0      | 0      |        |        |        |        |        |
|         | 0,88           | 0                | 0      | 0      |        |        |        |        |        |
|         |                | 1,00             | 0      | 0      |        |        |        |        |        |
| Framida | R <sub>f</sub> | Keimungsrate [%] |        |        |        |        |        |        |        |
|         |                | Exp. 1           | Exp. 2 | Exp. 3 | Exp. 4 | Exp. 5 | Exp. 6 | Exp. 7 | Exp. 8 |
|         | 0,06           | 0                | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
|         | 0,18           | 0                | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
|         | 0,29           | 0                | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
|         | 0,41           | 0                | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
|         | 0,53           | 0                | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
|         | 0,65           | 0                | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
|         | 0,76           | 0                | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
|         | 0,88           | 0                | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
|         |                | 1,00             | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |

Beobachtungen:  
(Wert) = Beobachtung nicht eindeutig.

Tab. 4-17: Identifizierung von Keimungsstimulanten im DC-Biotest – Sorghum-Wurzelexsudate.

| IS-9830        |        | Keimungsrate [%] |        |  |
|----------------|--------|------------------|--------|--|
| R <sub>i</sub> | Exp. 1 | Exp. 2           | Exp. 3 |  |
| 0,06           | 0      | 0                | 0      |  |
| 0,18           | 0      | 0                | 0      |  |
| 0,29           | (KA)   | 0                | 0      |  |
| 0,41           | 0      | 0                | 0      |  |
| 0,53           | 0      | 0                | 0      |  |
| 0,65           | 0      | 0                | 0      |  |
| 0,76           | 0      | 0                | 0      |  |
| 0,88           | 0      | 0                | 0      |  |
| 1,00           | 0      | 0                | 0      |  |

| Seredo         |        | Keimungsrate [%] |        |        |        |        |        |        |        |         |         |         |         |  |
|----------------|--------|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|--|
| R <sub>i</sub> | Exp. 1 | Exp. 2           | Exp. 3 | Exp. 4 | Exp. 5 | Exp. 6 | Exp. 7 | Exp. 8 | Exp. 9 | Exp. 10 | Exp. 11 | Exp. 12 | Exp. 13 |  |
| 0,06           | 0      | 0                | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0       | 0       | 2,3     | 0,5     |  |
| 0,18           | 0      | 0                | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0       | 0       | 0       | 0       |  |
| 0,29           | 0      | 0                | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0       | 0       | 0       | 0       |  |
| 0,41           | 0      | 0                | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0       | 0       | 0       | 0       |  |
| 0,53           | 0      | 0                | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0       | 0       | 0       | 0       |  |
| 0,65           | 0      | 0                | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0       | 0       | 0       | 0       |  |
| 0,76           | 0      | 0                | 0      | 0      | 0      | 0,3    | 0      | 0      | 0,4    | 0       | 0       | 0       | 0       |  |
| 0,88           | 0      | 0                | 0      | 0      | 0      | 0      | 0,9    | 0      | 0      | 0       | 0       | 0       | 0       |  |
| 1,00           | 0      | 0                | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0       | 0       | 0       | 0       |  |

| E-36-1         |        | Keimungsrate [%] |  |
|----------------|--------|------------------|--|
| R <sub>i</sub> | Exp. 1 | Exp. 2           |  |
| 0,06           | 0      | 0                |  |
| 0,18           | 0      | 0                |  |
| 0,29           | 0      | 0                |  |
| 0,41           | 0      | 0                |  |
| 0,53           | 0      | 0                |  |
| 0,65           | 0      | 0                |  |
| 0,76           | 0      | 0                |  |
| 0,88           | 0      | 0                |  |
| 1,00           | 0      | 0                |  |

Beobachtungen:

(KA) = Keimungsansatz,

Beobachtung nic

Beobachtungen:  
(KA) = Keimungsansatz,  
Beobachtung nicht eindeutig.



Tab. 4-18: Identifizierung von Keimungsstimulanten im DC-Biotest – Sorghum-Wurzelexsudate.

| M-35-1 | R <sub>f</sub> | Keimungsrate [%] |        |        |
|--------|----------------|------------------|--------|--------|
|        |                | Exp. 1           | Exp. 2 | Exp. 3 |
|        | 0,06           | 0                | 0      | 0      |
|        | 0,18           | 0                | 0      | 0      |
|        | 0,29           | 0                | 0      | 0      |
|        | 0,41           | 0                | 0      | 0      |
|        | 0,53           | 0                | 0      | 0      |
|        | 0,65           | 0                | 0      | 0      |
|        | 0,76           | 0                | 0      | 0      |
|        | 0,88           | 0                | 0      | (0,9)  |
|        | 1,00           | 0                | 0      | 0      |

| DS-1195 | R <sub>f</sub> | Keimungsrate [%] |        |
|---------|----------------|------------------|--------|
|         |                | Exp. 1           | Exp. 2 |
|         | 0,06           | 0                | 0      |
|         | 0,18           | 0                | 0      |
|         | 0,29           | 0                | 0      |
|         | 0,41           | 0                | 0      |
|         | 0,53           | 0                | 0      |
|         | 0,65           | 0                | 0      |
|         | 0,76           | 4                | 0      |
|         | 0,88           | 0                | 0      |
|         | 1,00           | 0                | 0      |

| IS-1037 | R <sub>f</sub> | Keimungsrate [%] |        |        |        |        |        |        |        |
|---------|----------------|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|         |                | Exp. 1           | Exp. 2 | Exp. 3 | Exp. 4 | Exp. 5 | Exp. 6 | Exp. 7 | Exp. 8 |
|         | 0,06           | 0                | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
|         | 0,18           | 0                | 0      | 0      | 0      | 0      | 0,6    | 0      | 0      |
|         | 0,29           | 0                | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
|         | 0,41           | 0                | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
|         | 0,53           | 0                | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
|         | 0,65           | 0                | 0      | 0      | 0      | 0,3    | 0      | 0      | 0      |
|         | 0,76           | 0                | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
|         | 0,88           | 0                | 0      | 0      | 0,9    | 0      | 0      | 0      | 0      |
|         | 1,00           | 0                | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |

Beobachtungen:  
(Wert) = Beobachtung nicht eindeutig.

Tab. 4-19: Identifizierung von Keimungsimulanzien im DC-Biotest – Sorghum-Wurzelexsudate.

| CSM-209 | R <sub>i</sub> | Keimungsrate [%] |        |        |        |        |
|---------|----------------|------------------|--------|--------|--------|--------|
|         |                | Exp. 1           | Exp. 2 | Exp. 3 | Exp. 4 | Exp. 5 |
| 0,06    | 0,2            | 0                | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 0,18    | 0              | 0                | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 0,29    | 0              | 0                | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 0,41    | 0              | 0                | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 0,53    | 0              | 0                | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 0,65    | 0              | 0                | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 0,76    | 0              | 0                | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 0,88    | 6              | 1,2              | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 1,00    | 0              | 0                | 0      | 0      | 0      | 0      |

| CSM-335 | R <sub>i</sub> | Keimungsrate [%] |
|---------|----------------|------------------|
|         |                | Exp. 1           |
| 0,06    | 0              | 0                |
| 0,18    | 0              | 0                |
| 0,29    | 0              | 0                |
| 0,41    | 0              | 0                |
| 0,53    | 0              | 0                |
| 0,65    | 0              | 0                |
| 0,76    | 0              | 0                |
| 0,88    | 0              | 0                |
| 1,00    | 0              | 0                |

## 5 DISKUSSION

*Striga hermonthica* ist eine parasitisch lebende Pflanze und ein großer Pflanzenschädling weltweit. *Striga* spp. wird von Autoren mitunter sogar als Geißel der Menschheit bezeichnet (MACILWAIN 1999). Vorwiegend in Afrika kommt es durch den Befall mit *S. hermonthica* zu erheblichen Ernteaussfällen bei Getreide. Stark betroffen sind u. a. die Hirsearten *Sorghum bicolor* und Pearl-Millet (*Pennisetum glaucum*). *S. hermonthica* bedroht damit die Grundversorgung mit Nahrung von über 300 Millionen Menschen (BABALEYE 1989). Doch auch eine Ausbreitung in andere Klimazonen, z. B. nach Europa, ist nicht auszuschließen. Ihre große Anpassungsfähigkeit erlaubt es *Striga*, sich schnell auf neue Wirte und Umweltbedingungen einzustellen – und *S. hermonthica* wurde schon in Gebieten Äthiopiens angetroffen, die klimatisch durchaus mediterranen Charakter besitzen.

Hat man die zunehmend hohen Ernteaussfälle vor Augen, so drängt sich immer stärker die Frage auf, wie man der Bedrohung durch *S. hermonthica* Herr werden kann. Der Einsatz von Herbiziden zeigt unterschiedlichen Erfolg. In einigen Fällen kann *S. hermonthica* damit gut kontrolliert werden, in anderen Fällen wird keine Verbesserung der Situation erreicht. Dazu kommen die Risiken aus dem Gebrauch solcher Chemikalien: Einflüsse auf die Umwelt (Bodenorganismen, Wasser) und auf den Menschen durch den Umgang mit Spritzmitteln sowie als Verbraucher der produzierten Nahrungsmittel. Darüber hinaus sind diese modernen „Wunderwaffen“ für das schmale Budget afrikanischer Bauern viel zu teuer. Einen sehr guten Erfolg in der Kontrolle von *S. hermonthica* zeigen traditionelle Landbewirtschaftungsmaßnahmen. Nachdem auch in Afrika in der jüngsten Vergangenheit immer mehr Monokulturen entstanden sind, mit ihren ungünstigen Folgen für den Nährstoffgehalt des Bodens und einem starken Befall mit *S. hermonthica* durch die Ansammlung einer großen Zahl an Parasitensamen im Boden, wird heute wieder zunehmend die traditionelle Landbewirtschaftung propagiert: Im integrierten Anbau kann durch Rotation, *Intercropping* und *Transplanting* auf natürlichem Weg eine erfolgreiche Bekämpfung durchgeführt werden. Eine andere Strategie, die in Afrika jetzt verstärkt in den Fokus moderner Anbaumethoden rückt, ist der Einsatz resistenter Nutzpflanzen. Eine resistente Pflanze muß nicht durch den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln vor Parasiten geschützt werden – sie bringt ihren Schutz schon selbst mit. So kann die Ausbreitung von Parasiten wie *S. hermonthica* in noch nicht stark befallenen Gebieten vermieden werden. In bereits infizierten Feldern wird die Steigerung des Befallsdrucks durch die Produktion von weiteren Parasitensamen verhindert und so (langfristig) die Parasitensamenzahl im Boden verringert.

Somit sind die Vorteile resistenter Pflanzen klar:

1. höherer Ertrag und keine Ernteaussfälle,
2. keine Gefährdung von Mensch und Umwelt durch den Einsatz von Herbiziden.

In Feldversuchen zeigte sich, daß bestimmte *Sorghum bicolor*-Varietäten nicht oder zumindest weniger von *Striga hermonthica* befallen werden als andere. Diese Varietäten besitzen also einen Schutzmechanismus, der den Befall durch *Striga* verhindert oder erschwert. Solche Schutz- oder Resistenzmechanismen haben sich in der Evolution durch die Jahrhunderte währende Interaktion zwischen Parasiten und ihren Wirten herausgebildet. Ziel von Züchtungsprogrammen ist es, dieses Potential in darüber hinaus ertragreiche Varietäten einzubringen. Die Resistenz von Wirtspflanzen gegenüber Phytoparasiten kann auf einem einzelnen Resistenzmechanismus beruhen, oder aber sie ist das Resultat aus der Addition und Kombination mehrerer Resistenzfaktoren. Verschiedene Resistenzfaktoren wurden in der vorliegenden Arbeit überprüft, ob sie bei bestimmten *S. bicolor*-Varietäten für die Resistenz gegenüber *S. hermonthica* verantwortlich sind. Wird in Folge von suszeptibel oder resistent gesprochen, so bedeutet dies nicht, daß die Existenz oder das Nichtvorhandensein von Resistenzfaktoren in bestimmten Pflanzen detailliert beschrieben sind, sondern nur, daß empirisch im Feldversuch bestimmte Varietäten einen mehr oder minder starken Befall mit *S. hermonthica* aufwiesen. Für die Entwicklung resistenter „Wirts“-Pflanzen sind auch Kenntnisse über das genetische Potential des Parasiten von entscheidender Bedeutung: Daher wurde eine vergleichende Untersuchung der Erbsubstanz (DNA) von *Striga hermonthica*-Pflanzen aus verschiedenen Regionen Afrikas (und dem Jemen) durchgeführt.

In dieser Diskussion werden die verschiedenen Aspekte der vorliegenden Arbeit in drei Abschnitten behandelt:

- Im ersten Abschnitt sollen verschiedene mögliche Resistenzmechanismen und ihre Rolle bei *Striga hermonthica* betrachtet werden.
- Abschnitt 2 beschäftigt sich mit der Anzucht von Parasiten- und Wirtspflanzen sowie mit Testsystemen zur Wirt-Parasit-Interaktion.
- Der letzte Abschnitt umfaßt verschiedene Ansätze zur taxonomischen Einordnung von *S. hermonthica* aus verschiedenen Herkünften (verschiedene Regionen und Erntejahre). Hier wird die bisher umfassendste Charakterisierung von *S. hermonthica* mittels RAPD-PCR beschrieben.

## 5.1 Resistenz gegenüber *Striga hermonthica*

### 5.1.1 Parasitische Exoenzyme

Wirtswurzelexsudate, die die Aktivität von bestimmten *Striga*-Exoenzymen verringern, sind ein möglicher Resistenzfaktor (HELLER und WEGMANN 2000). Exoenzyme sind nötig, damit die *Striga*-Keimwurzel durch die verschiedenen Gewebe der Wirtswurzel bis zum Zentralzylinder vordringen kann. Dazu ist der Abbau bzw. die Desintegration von Stoffen wie Pektin, Hemicellulose und Cellulose erforderlich (SHOMER-ILAN 1993 und 1994, BROOKS 1995, BAUMANN 1996, BÄCKER 1997). Am Zentralzylinder wird schließlich der Anschluß an das Gefäßsystem des Wirts hergestellt. Ein Baustein primärer Zellwände ist der Zucker Xylose. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß *Striga hermonthica* als C-Quelle die Pentose Xylose verwenden kann. Die Fähigkeit zur Xylose-Verwertung ist bei höheren Pflanzen äußerst selten vertreten. Die durch zellwand-abbauende Enzyme freigesetzten Xylose-Bausteine könnten so von *S. hermonthica* gleich metabolisiert werden (OKONKWO 1966b). In den Testsystemen zur Beeinflussung der Exoenzymaktivität führte die Zugabe von Wurzelexsudaten aller getesteten Sorghum-Varietäten, suszeptibler wie resistenter, zum Anstieg der Aktivität der Endocellulase. Die Aktivität der Enzyme Endoxylanase und  $\beta$ -Glucosidase wurde durch Zugabe der Wurzelexsudate verringert. Die Polygalacturonase-Aktivität wurde durch Exsudate der suszeptiblen Sorghum-Varietäten E-36-1, IS-1037 und DS-1195 sowie der resistenten Varietäten Framida und IS-9830 gesteigert. Dagegen verringerte Exsudat der resistenten Varietät Seredo die Enzymaktivität. In den Aktivitätstest mit den Enzymen Endocellulase und Endoxylanase zeigte sich eine sehr große Streuung für die verschiedenen Varietäten zwischen den einzelnen Experimenten. Für alle untersuchten Exoenzyme ist beim Vergleich der Varietäten untereinander keine signifikante Gruppierung der Aktivitätswerte festzustellen. Eine Korrelation der Ergebnisse der Beeinflussung der Exoenzymaktivität durch Sorghum-Wurzelexsudate mit der Einstufung der Varietäten als resistent oder suszeptibel liegt auf Basis der erhobenen Daten nicht vor: So zeigten Wurzelexsudate resistenter Varietäten keine signifikant größere Hemmung bzw. geringere Steigerung der Exoenzymaktivität als suszeptible Varietäten. Einzig das Ergebnis für die resistente Sorghum-Varietät Seredo sticht bei der Untersuchung der Polygalacturonase-Aktivität durch die Verminderung der Enzymaktivität aus dem Gesamtbild heraus. Da nicht ausreichend Exsudate zur Verfügung standen, konnte dieses Ausnahmeverhalten allerdings nicht weiter untersucht werden. Beeinflußt wurden die Aktivitätstest möglicherweise auch durch die bei den Pflanzen der verschiedenen Varietäten unterschiedlich groß entwickelten Wurzelballen, die zur Exsudatgewinnung verwendet wurden. Ob diese unterschiedlichen

Wurzelausmaße eine Relevanz haben, da sie die natürlichen Anlagen der Varietäten widerspiegeln oder ob sie aus den unnatürlichen Anzuchtbedingungen im Gewächshaus resultierten, kann nicht entschieden werden. Die These von einer Interaktion zwischen „Wirts“-Wurzelexsudaten und Exoenzymen wird durch die Versuchsergebnisse nicht gestützt, sie kann jedoch auch nicht völlig ausgeschlossen werden. Vor allem können die Labortests die natürlichen Bedingungen nur unzureichend wiedergeben: So berücksichtigen sie nicht eine mögliche Modifikation der Substanzen, z. B. durch Mikroorganismen im Boden. Auch wurden für die Tests nicht die originären Exoenzyme aus *S. hermonthica*, sondern Enzyme aus anderen Organismen eingesetzt, die die gleiche Reaktion katalysieren. Dies geschah aus praktischen Überlegungen: Die Gewinnung von Exoenzymen der *S. hermonthica*-Keimwurzeln ist nur unter hohem Aufwand möglich, und auch dann werden die Exoenzyme nur in äußerst geringen Mengen produziert. Dies erschwert schon allein deren Nachweis geschweige denn den Einsatz in Testreihen zur Untersuchung der Beeinflussung durch Wurzelexsudate. Für die Gewinnung der Enzyme in größeren Mengen müßte ein Überexpressionssystem entwickelt werden, was die Klonierung der Gene zur Voraussetzung hätte. Ein Nachteil eines solchen Systems wäre aber weiterhin, daß etwaige posttranslationale Modifikationen, die sehr entscheidend für den Wirkmechanismus und die Interaktion sein könnten, nicht berücksichtigt würden.

### 5.1.2 *Phytoalexine*

Ein weiterer möglicher Resistenzmechanismus ist die Produktion und Abgabe von Phytoalexinen aus den Wirtswurzeln. So wehren bestimmte Pflanzen den Angriff von Phytoparasiten durch die Synthese von Phytoalexinen ab. Ein Beispiel hierfür ist die Abwehr von *Orobanch* spp., einer nahe mit *Striga* verwandte Gattung, durch resistente Sonnenblumen-Varietäten (WEGMANN 1986). Da es schwierig ist, die Abgabe von Phytoalexinen im jeweiligen Wirt-Parasit-System direkt zu untersuchen, setzt man alternative Testsysteme ein. Dabei macht man sich folgende Umstände zunutze: 1. Die Synthese und Abgabe von Phytoalexinen wird nicht nur von Phytoparasiten induziert, sondern es gibt eine ganze Reihe von Auslösern: Elicitoren wie z. B. Polysaccharide und Zellwandbestandteile, Pilze und Viren, oder auch Streßfaktoren wie Hitze und Kälte. 2. Phytoalexine wirken auf verschiedene Organismen toxisch, so z. B. auf Bakterien, Pilze und andere Parasiten (HEMLEBEN 1990, KÚC 1995). Die toxische Wirkung läßt sich mithilfe verschiedener Organismen, wie z. B. bestimmten Pilzstämmen, nachweisen (HOMANS und FUCHS 1970, FREY und ZIELOFF 1993). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde als Biotestorganismus

*Aspergillus niger* eingesetzt. Die anderen getesteten Pilzstämme *Cladosporium herbarum*, *Botrytis cinerea* und *Neurospora crassa* erwiesen sich als ungeeignet, da sie nur ein unzureichendes Wachstum auf den Dünnschichtchromatographie (DC)-Platten zeigten und die Standardisierung mit bekannten Phytoalexinen nicht erfolgreich verlief. Exsudate und Extrakte von Sorghum-Wurzeln verschiedener Varietäten wurden gesammelt. Auf der DC-Platte zeigte der Pilz *Aspergillus niger* im Bereich der Applikation aller Wurzelextrakte und Acetonlösungen ein gehemmtes Wachstum. Dabei machte es keinen Unterschied, ob es sich dabei um Proben von Pflanzen, die als suszeptibel oder die als resistent eingestuft waren, handelte. Auch zeigten Proben, die von Pflanzen stammten, zu deren Wurzeln ein Elicitor bzw. Induktor (Hefezellwandbestandteile oder *Aspergillus niger*-Sporen) zugegeben worden war, keine anderen Ergebnisse als solche von unbehandelten Kontrollpflanzen. Auch bei der Untersuchungen mittels dünnenschichtchromatographischer Auftrennung wurden keine Unterschiede (verschiedene Bandenmuster) zwischen den Proben elicitierter Pflanzen verglichen mit denen von Kontrollpflanzen gefunden. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß keine Stoffe identifiziert werden konnten, die als Antwort auf einen Reiz (Elicitor) produziert worden waren, und die somit als Phytoalexine zu klassifizieren wären. Der Umstand, daß man Phytoalexine zwar in Blättern von Sorghum nachweisen konnte, nämlich Apigeninidin und Luteolinidin (NICHOLSON *et al.* 1987, HIPSKIND *et al.* 1990), in den Wurzelproben aber keine zu identifizieren sind, steht in Übereinstimmung mit dem generellen Befund, daß die Kapazität zur Bildung von Phytoalexinen in den Wurzeln meist weniger stark ausgeprägt ist als in den Blättern (WEGMANN 1996). Möglicherweise konnten mit den verwendeten Untersuchungsmethoden kleinste, nur lokal vorhandene Mengen an Phytoalexinen nicht erfaßt werden. Für die Untersuchung solcher geringster Stoffmengen müßten ausschließlich die winzigen Infektionsstellen Wirt – *S. hermonthica* in großer Zahl (Stoffmenge!) gesammelt und analysiert werden.

### 5.1.3 Lignifizierung

Ein möglicher mechanischer Resistenzmechanismus ist die Verholzung der Wurzeln. Von Lignifizierung als Resistenzfaktor wird im Fall der Sorghum-Varietäten N-13, Framida und IS-4202 berichtet (MAITI *et al.* 1984, RAMAIAH 1987). Die Wurzeln von Sorghum-Varietäten, deren Resistenz (u. a.) auf diesem Faktor beruht, müßten einen erhöhten Ligningehalt aufweisen. <sup>13</sup>C-Festkörper-NMR-Spektren wurden von Proben zermahlener junger Wurzeln verschiedener Sorghum-Varietäten aufgenommen: N-13, 555, Framida, IS-9830, Seredo und E-36-1. In den <sup>13</sup>C-NMR-Spektren der Wurzelproben konnten keine für Lignin

charakteristischen Peaks indentifiziert werden. Die Spektren der Wurzelproben der verschiedenen Sorghum-Varietäten zeigten außerdem keine signifikanten Unterschiede, gleich ob die Varietäten als resistent oder suszeptibel eingestuft waren. Auch bei den oben erwähnten Varietäten N-13 und Framida, für die mechanische Resistenzfaktoren postuliert worden waren, ergaben sich in den NMR-Spektren keine Hinweise auf einen erhöhten Ligningehalt. Diese Aussage trifft aber nur für die Untersuchung der gesamten Wurzelmasse junger Sorghum-Wurzeln zu. Betrachtete man nur den ganz begrenzten Bereich eines Haustoriums, also einer Infektionsstelle Wirt – *S. hermonthica*, so könnte der Ligningehalt in den Messungen durchaus differieren. Die Isolierung und Untersuchung einzelner Infektionsstellen ist aber äußerst aufwendig und schwierig, denn man benötigte eine große Zahl solcher Infektionsstellen und einen breiten Querschnitt durch die Population. Eine solche Probensammlung ließe sich ausschließlich direkt vor Ort in infizierten Feldern durchführen. Darüber hinaus könnte man die Wurzeln auch auf die Einlagerung anderer, die Infektion verhindernder oder hemmender Stoffe untersuchen, z. B. auf die Einlagerung von Callose. Histologische Untersuchungen einzelner Infektionsstellen ließen sich unter Verwendung spezifischer Färbeverfahren durchführen, möglich wäre auch der Einsatz spezifischer Antikörper mit Fluoreszenzmarkern.

#### **5.1.4 Keimung**

Auch Eingriffe in die Mechanismen rund um die Keimung von *Striga hermonthica* lassen sich für die Züchtung resistenter *Sorghum bicolor*-Varietäten nutzen. Ein Beispiel dafür ist der Resistenzfaktor *low stimulant* (KUMAR 1940, HESS *et al.* 1992). Bestimmte *S. bicolor*-Pflanzen produzieren weniger Keimungsstimulans als suszeptible Varietäten. Durch die Abgabe von weniger oder gar keinen Stimulantien wird die Keimung von *S. hermonthica* nicht oder zumindest wesentlich geringer induziert. Die *S. bicolor*-Pflanzen werden so weniger oder gar nicht befallen. Die Vorstellung von der Produktion nur eines die Keimung stimulierenden Stoffes ist aber zu vereinfachend. Bekannt ist, daß *S. bicolor* mehr als eine Substanz produziert, die die Keimung von *S. hermonthica* induzieren kann – Sorghum-Pflanzen produzieren somit ein Bouquet an Keimungsstimulantien.

##### **5.1.4.1 Keimungsrate und TTC-Test**

Die Keimfähigkeit von Samen wird häufig mittels TTC-Test (KUHN und JERCHEL 1941, EPLEE und NORRIS 1987) bestimmt. Hierbei wird das farblose 2,3,5-Triphenyl-



tetrazoliumchlorid (TTC) durch Reduktionsäquivalente und mitochondriale Dehydrogenasen in lebensfähigen Samen zu rotem, wasserunlöslichem Formazan reduziert. Somit weist der Test eigentlich nur eine Stoffwechselaktivität nach, die nicht unbedingt mit der Keimfähigkeit der Samen gleichzusetzen ist. In der Praxis wird diese Vereinfachung jedoch vielfach gemacht, und der TTC-Test als Nachweis der Vitalität und Keimfähigkeit von Samen verwendet. Im Rahmen der Arbeit wurde überprüft, ob mithilfe des TTC-Tests Aussagen über die Keimfähigkeit sowohl von *S. bicolor*- als auch von *S. hermonthica*-Samen getroffen werden können. Für *S. bicolor* wurden Tests mit Samen der Varietät N-13 durchgeführt. Samen, die nach der Inkubation in TTC-Lösung eine rotgefärbte Schale zeigten, wurden als TTC-positiv eingestuft. Halbte man diese Samen, so war im Querschnitt deutlich der tiefrotgefärbte Embryo gegenüber dem weißen Speichergewebe zu erkennen. Im TTC-Test waren alle N-13-Samen positiv. TTC-positiv heißt im Sinne des TTC-Tests auch keimfähig. Somit ergab der TTC-Test für N-13 eine 100%ige Keimfähigkeit. Dagegen ergaben Keimungstests in Petrischalen auf feuchtem Filtrierpapier nur eine Keimungsrate von 0–30 %. Als Grundlage für die weiteren Versuche war nur die Zahl der Samen, die unter den Versuchsbedingungen tatsächlich zur Keimung gebracht werden konnten, relevant. Diese Zahl wurde durch die Keimungstests ermittelt. Die Ergebnisse der TTC-Tests korrelierten mit diesen Werten aber nicht. Somit war der TTC-Test zur Abschätzung der Keimfähigkeit von *S. bicolor*-Samen im Rahmen dieser Arbeit nicht geeignet. Auch die Keimfähigkeit von *S. hermonthica*-Samen wurde überprüft. Hierfür wurden Samen der Herkunft Mali 95 (M/95) verwendet. Welche Samen im TTC-Test als positiv einzustufen waren, diese Entscheidung war bei *Striga*-Samen längst nicht so eindeutig zu treffen wie bei Sorghum-Samen. Neben roten und weißen Samen gab es auch verschiedene farbliche Nuancen. Weitere Untersuchungen, wie z. B. das Halbieren der Samen, waren aufgrund der mikroskopischen Größe der *Striga*-Samen nicht möglich. Die Wertung aller deutlich roten Samen ergab, daß 40 % der *Striga*-Samen als TTC-positiv einzustufen waren. Keimungstests mit dem Keimungsstimulans GR 24 führten zu einer Keimungsrate von 50–70 % in den Petrischalen. Somit bestand auch bei *Striga*-Samen eine deutliche Diskrepanz zwischen den beiden Testverfahren, wenn auch geringer als bei *S. bicolor*-Samen. Der TTC-Test sollte daher auch für die Bestimmung der Keimfähigkeit von *S. hermonthica*-Samen nicht angewandt werden. Interessanterweise sind diese Ergebnisse für *Striga* genau gegensätzlich zu denen von EPLEE und NORRIS (1987): Sie beobachteten mehr Samen, die im TTC-Test positiv eingestuft worden waren, als Samen deren Keimung sie mit Keimungsstimulans hatten induzieren können.

#### 5.1.4.2 Konditionierung

*Striga*-Samen müssen erst eine Phase der Konditionierung durchlaufen, bevor sie auskeimen können. Die biochemischen Prozesse, die dabei stattfinden, sind noch nicht aufgeklärt. Denkbare Vorgänge sind das Auswaschen von Keimungsinhibitoren, die Produktion von Stoffen, die für die Keimung nötig sind, oder die Veränderung der Permeabilität der Samenstruktur. Ohne Konditionierung lag die Keimungsrate (nach Stimulanzugabe) bei nur 4 %. Mit zunehmender Konditionierungsdauer stieg die Rate steil an und erreichte nach acht Tagen 40–54 %. Wurde die Konditionierung noch länger ausgedehnt, so erhöhte sich die Keimungsrate langsam ansteigend auf 55–65 %. Die maximal erreichte Keimungsrate in einem Experiment (dieser Arbeit) lag bei 71 %. Nach 25 Tagen Konditionierungsdauer sank dann die Keimungsrate wieder langsam ab.

#### 5.1.4.3 Keimungsinduktion

Für die Induktion der Keimung von *Striga hermonthica* ist normalerweise ein chemischer Stimulus erforderlich. Als Keimungsstimulantien dienen u. a. Stoffe, die von Wirtspflanzen ausgeschieden werden. Auch synthetisch hergestellte Substanzen, wie das mit dem natürlichen Strigol strukturverwandte GR 24, induzieren die Keimung von *Striga*. KUST (1963) berichtete dagegen von Fällen, bei denen *Striga asiatica*-Samen auch ohne Zusatz eines Induktors keimten, sogenannten „Spontankeimungen“. FISCHER (1997) beschrieb dies auch für *S. hermonthica*. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit traten Fälle von Spontankeimung bei *S. hermonthica* kein einziges Mal auf. Möglicherweise wurden bei den Berichten von „Spontankeimungen“ auch die Bedingungen, unter denen die Versuche durchgeführt worden waren, nicht richtig bewertet: Fischer wählte zur Oberflächensterilisation der *Striga*-Samen äußerst „harte“ Bedingungen: Die Samen wurden u. a. 15 min in 70%igem Ethanol und anschließend 30 min in 10%igem Natriumhypochlorit inkubiert. Darauf folgte noch eine Ultraschallbehandlung. Bei dieser Form der Behandlung kann es sehr wohl zur Keimungsinduktion gekommen sein, denn auch Natriumhypochlorit besitzt eine keimungsinduzierende Wirkung (HSAIO *et al.* 1981). Möglicherweise wurde auch durch die Ultraschallbehandlung der Samen der Keimungsprozeß ausgelöst. In dieser Arbeit wurde das Keimungsstimulans GR 24 zur Standardisierung der Keimungstests in Petrischalen verwendet. Keimungsstimulantien wirken schon in äußerst geringen Konzentrationen. Die minimale Konzentration an GR 24, bei der eine signifikante Keimung von *S. hermonthica*-Samen induziert werden konnte, lag bei  $3 \times 10^{-6}$  ppm. Bei einer Konzentration von 0,3 ppm

wurde eine Keimungsrate von 67 % im Mittel erzielt. Die Erhöhung der Konzentration auf 3 ppm brachte keine weitere Steigerung, die maximal mögliche Keimungsrate wurde also bereits bei 0,3 ppm erreicht. Für die Tests wurde standardmäßig eine Konzentration von 0,03 ppm GR 24 verwendet. Diese führte zu einer für die Versuche ausreichenden Keimungsrate von 57 % im Mittel.

#### 5.1.4.4 Keimungsrate in Abhängigkeit der Samenzahl im Test

In verschiedenen Arbeiten (EGLEY und DALE 1970, CHANCELLOR *et al.* 1971, EPLEE 1975, JACKSON und PARKER 1991, LOGAN und STEWART 1991, BABIKER *et al.* 1993) wurde diskutiert, daß Ethylen als Keimungsstimulans wirken kann und daß Ethylen bei der Keimung von Samen entsteht. So stellte sich die Frage, ob in Petrischalenversuchen Keimung nicht nur primär durch das Stimulans induziert wird, sondern möglicherweise auch sekundär durch das von bereits keimenden Samen produzierte Ethylen. In Petrischalen, in denen sich mehr *Striga*-Samen befinden, könnten durch Keimungsstimulantien auch mehr Samen zur Keimung angeregt werden. Diese könnten (absolut) mehr Ethylen produzieren, welches wiederum die Keimung bei bis dahin noch nicht gekeimten Samen induzieren könnte. Die Folge wäre eine (auch) prozentual höhere Keimungsrate. Die Versuche zeigten aber, daß die Keimungsrate nicht von der Zahl der Samen im Versuchsansatz abhängig war.

## 5.2 Interaktion Wirt – Parasit *Striga hermonthica*

### 5.2.1 *Keimungsinduzierende Stoffe in Sorghum- und Millet-Wurzelexsudaten*

#### 5.2.1.1 Konzentrieren keimungsinduzierender Stoffe

Die Keimungsraten bei *Striga hermonthica*-Samen, die mit Sorghum- und Millet-Wurzelexsudaten zur Keimungsinduktion erzielt werden konnten, stellten sich als relativ niedrig heraus. Daher wurden Versuche unternommen, die Konzentration der Stimulantien in den Proben zu erhöhen. Zwei Verfahren wurden untersucht: Lyophilisieren und Konzentrieren über dem Trocknungsmittel Blaugel. Zur Standardisierung wurden die Versuche des Lyophilisierens zunächst mit dem Keimungsstimulans GR 24 durchgeführt. Die Wiederfindungsrate lag bei 100 %. Die Keimungsrate ohne Konzentrierung betrug 44 %. Die Anreicherung um das Zehnfache ergab einen Anstieg der Keimungsrate auf 55 %. Eine stärkere Konzentrierung um Faktor 50 erbrachte keine Steigerung der Keimungsrate über das

bei Faktor 10 erzielte Maß hinaus. Eine Konzentrierung der Proben des Keimungsstimulans GR 24 durch Lyophilisieren war somit im gewissen Rahmen möglich. Konzentrierungsversuche der Wurzelexsudate von Sorghum- und Millet-Pflanzen führten dagegen zum völligen Verlust deren Fähigkeit zur Keimungsinduktion. Die Konzentrierung über Blaugel führte für GR 24 zu ähnlichen Ergebnissen wie beim Lyophilisieren. Sorghum- und Millet-Wurzelexsudate zeigten nach der Konzentrierung maximal die gleiche Keimungsrate wie die Rohexsudate, ein großer Teil der Exsudate verlor seine keimungsinduzierende Wirkung. Somit war es mit beiden Verfahren nicht möglich, die Wurzelexsudatproben generell für die weiteren Untersuchungen in der Dünnschichtchromatographie zuverlässig zu konzentrieren.

#### 5.2.1.2 Dünnschichtchromatographie

Zur Charakterisierung der Keimungsstimulantien aus den Wurzelexsudaten mußte eine Auftrennung der Rohexsudate durchgeführt werden. Nicht bekannt war die chemische Natur der Stoffe, die in den Exsudaten der untersuchten Varietäten für die Keimungsinduktion verantwortlich waren. Deshalb wurde ein Verfahren gewählt, bei dem ein Verlust der Substanzen durch die unklaren (Bindungs-) Eigenschaften ausgeschlossen war. Bei säulenchromatographischen Verfahren wie der *HPLC* (*High Performance Liquid Chromatography*) ist dies nicht auszuschließen, hier können die Stoffe z. B. auf der Säulenmatrix haften bleiben. Ideal dagegen ist die Dünnschichtchromatographie (DC): Die Stoffe bleiben bei diesem Verfahren immer auf der Platte. Im ungünstigsten Fall, bei der Wahl ungeeigneter Laufmittel, werden sie nur nicht aufgetrennt. Voraussetzung für eine Identifikation ist der Nachweis der Stoffe auf der DC-Platte. Getestet wurden die Verfahren zunächst am Keimungsstimulans GR 24. GR 24 ist bei den geringen Probenmengen nicht farbig, zeigt keine Fluoreszenz unter UV-Licht und läßt sich auch durch die verschiedensten Anfärbemethoden nicht sichtbar machen. Einzig durch Fluoreszenzlöschung des Indikators der stationären Phase unter UV-Licht bei  $\lambda = 254 \text{ nm}$  konnte es im Chromatogramm nachgewiesen werden. GR 24 zeigte zwei reproduzierbare Banden mit den  $R_f$ -Werten 0,66 und 0,75, allerdings auch nur bei den für Keimungsstimulantien hohen Konzentrationen ab 3 ppm. Diese zwei Substanzflecken könnten die Auftrennung des Racemats von GR 24 in die zwei Diastereomerenpaare widerspiegeln. Auch THURING *et al.* (1997) beschrieben bei ihrer Synthese von Strigol-analogen Verbindungen die Trennung der Diastereomeren von GR 24 mittels Dünnschichtchromatographie. In der DC aufgetrennte Proben der Sorghum- und

Millet-Wurzelexsudate zeigten unter Anwendung der getesteten Nachweisverfahren keine charakteristischen Banden. Dies ist nicht erstaunlich, denn meist liegen natürliche Keimungsstimulantien in wesentlich niedrigeren Konzentrationen vor, oft unterhalb der Nachweisgrenze physikalischer Meßmethoden. Als Ausweg bot sich da der Nachweis über einen Bioindikator an. In der durchgeführten Bioautographie diente die Keimung von *S. hermonthica*-Samen als hochspezifischer Indikator für die Anwesenheit von Keimungsstimulantien – und das bei geringsten Substanzmengen: Wie bereits weiter oben beschrieben, ließen sich schon  $3 \times 10^{-6}$  ppm GR 24 durch einen Keimungstest nachweisen.

#### 5.2.1.3 Bioautographie mit *Striga hermonthica*-Samen

*S. hermonthica*-Samen können nur in einer feuchten Umgebung keimen. Werden DC-Platten angefeuchtet, so trocknen sie schnell ab – zu schnell für den mehrere Tage dauernden Induktionsversuch. Als feuchtigkeitserhaltend bewährte sich das Übersichten mit 0,7%igem Wasseragar. Die Verwendung von Agar brachte aber ein Problem mit sich: Durch das Auftragen des Agars und die Feuchte kam es zur Mobilisierung der Substanzen auf der DC-Platte und damit zur Verbreiterung der Banden. So wurde in einem Vortest mit GR 24 die Keimung von *S. hermonthica*-Samen noch in 4 cm Entfernung von der Stelle induziert, an der GR 24 punktförmig auf die DC-Platte appliziert worden war. Um die großflächige Verbreiterung der Banden auf der DC-Platte zu unterbinden, wurden die Platten nach abgeschlossenem DC-Lauf in Abschnitte mit je 1 cm Laufstrecke zerschnitten. Auf diese DC-Abschnitte wurden anschließend *S. hermonthica*-Samen und Wasseragar aufgebracht. Die Zone maximaler Keimungsrate wurde für das Keimungsstimulans GR 24 in der Mehrzahl der Experimente mit einem mittleren  $R_f$ -Wert von 0,76 ermittelt. Bei einigen wenigen Versuchen gab es eine Verschiebung zum Abschnitt mit dem kleineren  $R_f$ -Wert von 0,65. Da die Abschnitte nur mit der groben Auflösung von 1 cm ausgewertet werden konnten, ist es möglich, daß eine nur geringe Schwankung für diesen scheinbar großen Effekt ausschlaggebend war. Solche kleinen Schwankungen könnten z. B. aus unterschiedlichen Umgebungstemperaturen bei den Trennungsexperimenten resultieren. Der  $R_f$ -Wert von 0,76 im Biotest entsprach in hoher Übereinstimmung dem Wert, der bei der dünnschichtchromatographischen Auftrennung von GR 24 für die zweite Bande ( $R_f = 0,75$ ) im Chromatogramm bestimmt worden war. Somit lag der Bereich mit hoher keimungsstimulierender Wirkung im Bereich von einer der zwei in der DC identifizierten GR 24-Banden. Dies unterstützt die Aussage, daß nur ein Stereoisomer von GR 24, nämlich

das mit der gleichen stereochemischen Konfiguration wie Strigol und Sorgolacton, für die Keimungsstimulation (hauptsächlich) verantwortlich ist (THURING *et al.* 1997). Die Exsudate der suszeptiblen Sorghum-Varietät DS-1195 sowie der suszeptiblen Millet-Varietät Soxsat zeigten wie GR 24 bei  $R_f = 0,76$  die maximale Keimungsinduktionsfähigkeit. Auch die resistente Sorghum-Varietät N-13 induzierte die Keimung der *Striga*-Samen bei  $R_f = 0,76$  maximal. Diese identischen  $R_f$ -Werte könnten ein Hinweis auf eine strukturelle Nähe der in den Exsudaten vorhandenen Keimungsstimulantien zu GR 24 bzw. Strigol sein. Exsudate der suszeptiblen Varietät IS-1037 sowie der resistenten Varietäten Seredo und 555 induzierten ebenfalls die Keimung von *S. hermonthica*-Samen im Biotest. Doch eine definierte Zone maximaler Keimung konnte in den Einzelexperimenten nicht bestimmt werden. Die  $R_f$ -Werte differierten von Experiment zu Experiment. Somit zeigte sich in den Versuchen, daß durchaus auch Wurzelexsudate resistenter Sorghum-Varietäten die Keimung von *S. hermonthica*-Samen induzieren können. Für die Varietät N-13 stellt dies keinen Widerspruch dar, werden hier doch mechanische Faktoren als Grundlage für die Resistenz vermutet. Die Art und Menge von Keimungsstimulantien braucht hier keine Rolle zu spielen. Für die Varietät Seredo ist der zugrundeliegende Resistenzmechanismus nicht bekannt. Schwieriger ist die Bewertung bei der Varietät 555, für die als Resistenzfaktor *low stimulant* postuliert wird und die trotzdem Keimung in der Bioautographie zeigte. Eine Erklärung hierfür könnte sein:

- a) *low stimulant* heißt nicht, daß gar keine Stimulantien gebildet werden, sondern nur, daß die Menge der gebildeten Stimulantien geringer ist. Ein solcher quantitativer Unterschied konnte in den Keimungstests nicht nachgewiesen werden: Der Test ist zu empfindlich und weist schon geringste Spuren von Keimungsstimulantien qualitativ (durch Samenkeimung) nach,
- b) *low stimulant* bedeutet nicht, daß durch das Wurzelexsudat der Wirtspflanze die Keimung von *Striga*-Samen nicht induziert werden kann. Möglicherweise werden neben den Keimungsstimulantien auch Keimungsinhibitoren gebildet, die die Wirkung der Stimulantien in der natürlichen Umgebung maskieren. Im DC dagegen werden die Stimulantien von den Inhibitoren abgetrennt, und die Stimulantien können so ihre induzierende Wirkung entfalten oder
- c) die Einstufung als *low stimulant* ist nicht richtig.

Die Unterschiede in den  $R_f$ -Werten der keimungsinduzierenden Stoffe machen deutlich, daß es sich in den Wirtswurzelexsudaten nicht nur um eine Substanz handeln kann, die zur Keimungsinduktion von *S. hermonthica*-Samen fähig ist. Vielleicht ist auch das Zusammenwirken von verschiedenen Stimulantien für die Keimungsinduktion nötig. Einzelne

Stoffe könnten dann in so geringen Konzentrationen auftreten, daß sie in der Bioautographie nicht nachweisbar sind. Erst durch das Zusammenwirken der verschiedenen Faktoren würde die Keimung induziert. Möglicherweise produziert jede Varietät auch ein ganz spezielles Bouquet an Stimulantien. Verschiedene Bouquets könnten eine unterschiedlich starke Fähigkeit zur Keimungsinduktion besitzen. Der bislang gebräuchliche Agargel-Test (HESS *et al.* 1992) ermöglicht keine Aussagen zu Charakteristika von keimungsstimulierenden Stoffen. Er mißt nur das Vermögen von Wirtspflanzen zur Keimungsinduktion von *Striga*-Samen in einem künstlichen Testsystem. Zur Quantifizierung des Keimungsinduktionsvermögens wird dabei der Abstand zwischen der Wirtswurzel und dem keimenden *Striga*-Samen, der sich am weitesten von der Wirtswurzel entfernt befindet, herangezogen. Unterschiede im Diffusionsvermögen der verschiedenen Keimungsstimulantien (und möglicherweise auch Keimungsinhibitoren) in der Agargel-Matrix im Vergleich zur natürlichen Umgebung bleiben unberücksichtigt.

In den Versuchen unter Verwendung des Biotests konnte nicht für alle Wirtswurzelexsudate, die zuvor in den Petrischalenkeimungstests die Keimung von *S. hermonthica*-Samen induziert hatten, eine keimungsinduzierende Wirkung nachgewiesen werden. Möglicherweise wurden Keimungsstimulantien so vom Kieselgel der DC-Platte adsorbiert, daß sie ihre keimungsinduzierende Wirkung auf die *Striga*-Samen nicht mehr ausüben konnten.

### 5.2.2 Haustorialentwicklung

Die Haustorialentwicklung wird ebenfalls als ein Ansatzpunkt für die Resistenzzüchtung diskutiert. Analog *low stimulant* bei der Keimung wird *low haustorial* als möglicher Resistenzmechanismus bei der Haustorialentwicklung untersucht (EJETA *et al.* 1993, REDA *et al.* 1994). Es wird allgemein angenommen, daß auch die Bildung von Haustorien bei *Striga* durch bestimmte Stoffe induziert wird. 2,6-Dimethoxy-p-benzochinon (engl. *2,6-dimethoxybenzoquinone*, 2,6-DMBQ) soll ein solcher Haustorialinduktor sein (CHANG und LYNN 1986, RIOPEL *et al.* 1986). Würde in der Interaktion von *Striga* mit bestimmten *Sorghum bicolor*-Varietäten weniger eines solchen Induktors vorhanden sein, so könnten dann auch weniger (keine) Haustorien etabliert werden, mit der Folge eines geringeren Befalls durch *Striga*. Doch die Entstehung von 2,6-DMBQ unterliegt wohl nicht einer geregelten Produktion. Untersuchungen von FRICK *et al.* (1996) ergaben, daß 2,6-DMBQ aus Syringasäure unter milder Oxidation mittels Peroxidase hergestellt werden kann. Die Syringasäure ist ein ubiquitär vorkommender Metabolit u. a. der Ligninbiosynthese. Peroxidaseaktivität konnte in

Keimwurzelexsudaten von *S. hermonthica* nachgewiesen werden (BÄCKER 1997). Somit ist es äußerst wahrscheinlich, daß 2,6-DMBQ immer als Beiprodukt der Interaktion des Parasiten mit Pflanzenwurzeln entsteht. Aus diesem Grund ist nicht zu erwarten, daß ein effektiver Resistenzmechanismus auf der Basis von *low haustorial* existiert (HELLER und WEGMANN 2000). Darüber hinaus stellen Beobachtungen im Rahmen dieser Arbeit die Rolle von 2,6-DMBQ als Haustorialinduktor generell in Frage: Als morphologisches Merkmal der eingeleiteten Haustorialentwicklung wurde in der Literatur die Bildung von Härchen auf der Epidermis besonders im vorderen Bereich der Keimwurzel beschrieben (NICKRENT *et al.* 1979, RIOPEL *et al.* 1986, SMITH *et al.* 1990). In den unter definierten Bedingungen durchgeführten Petrischalenexperimenten zeigten viele Keimwurzeln aber bereits nach der Keimungsinduktion mit GR 24 oder mit Wurzelexsudaten solche Härchen an den Keimwurzelspitzen. Die anschließende Zugabe von 2,6-DMBQ hatte dann keine weiteren sichtbaren Veränderungen zur Folge. Weder kam es zur Veränderung des Erscheinungsbildes der Keimwurzeln mit Härchen noch wurde die Bildung neuer Härchen induziert. Keimwurzeln, die nach der Induktion mit GR 24 oder Wurzelexsudat keine Härchen zeigten, bildeten diese auch nicht nach Zugabe von 2,6-DMBQ. Diese Versuchsergebnisse lassen folgende Interpretationen zu:

- a) Bei den Versuchen mit dem Keimungsstimulans GR 24 handelte es sich um definierte Petrischalensysteme, in denen kein 2,6-DMBQ vorhanden war. Somit hätte, vorausgesetzt die Härchenbildung kann nur durch ein spezielles Stimulans induziert werden, dieses Stimulans von den *Striga*-Keimlingen selbst hergestellt werden müssen. Darüber, daß *S. hermonthica* selbst einen Haustorialinduktor herstellt, gibt es keine Hinweise. Warum nicht alle Keimwurzeln nach der anschließenden Zugabe von 2,6-DMBQ Härchen zeigten, läßt sich so nicht erklären.
- b) Die beobachtete Härchenbildung hat mit der Induktion durch einen Haustorialinduktor nichts zu tun. Erst spätere Entwicklungsschritte bedürfen eines solchen Stimulans.
- c) Ein spezieller Haustorialinduktor ist für die Einleitung der Haustorienbildung bei *S. hermonthica*, sichtbar durch die Ausbildung feiner Härchen an den Keimwurzelspitzen, nicht erforderlich.



### 5.2.3 Pflanzenanzucht und Testsysteme

Die Anzucht von *Striga hermonthica*-Pflanzen erfolgte zum einen auf Wirtspflanzen im Gewächshaus, zum anderen gelang es, ein System zu entwickeln, das die Kultivierung *in vitro* unabhängig von Wirtspflanzen und auch ganz ohne Stoffe von Wirtspflanzen ermöglichte. Wechselwirkungen von Parasiten und Wirtspflanzen ließen sich in Cokulturen in Petrischalen verfolgen.

#### 5.2.3.1 Anzucht von *Striga hermonthica* auf Sorghum und Millet im Gewächshaus

Die Anzucht von *Striga hermonthica* gelang auf Wirtspflanzen sowohl von suszeptiblen als auch resistenten Sorghum-Varietäten und auch auf Millet-Pflanzen im Topfversuch. Resistente Varietäten zeigten aber einen geringeren Befall, eine geringere Zahl von *S. hermonthica*-Pflanzen als die suszeptiblen Varietäten. Die Resistenzmechanismen kamen im Topfversuch demnach nicht oder nur unzureichend zum Tragen. Möglicherweise war der Befallsdruck im Topfversuch, verstärkt durch die unnatürlichen Verhältnisse in den Töpfen und im Gewächshaus (Streß!), auf die Sorghum-Pflanzen lokal so stark, daß die Resistenzmechanismen durchbrochen werden konnten. Generell erforderte die Anzucht im Gewächshaus Temperaturen von über 20 °C und viel Licht. Voraussetzung war hier die zusätzliche künstliche Beleuchtung, die tagsüber sehr hohe Lichtstärken ermöglichte, wie sie am natürlichen Standort in Afrika üblich sind. Auch eine gute Bewässerung der Töpfe war für die *Striga*-Entwicklung entscheidend. Die Spaltöffnungen von *S. hermonthica* reagieren nur schwach auf Abscisinsäure (SHAH *et al.* 1987, SMITH und STEWART 1990) und sind daher fast immer geöffnet. Aus der damit verbundenen außerordentlich hohen Transpirationsrate resultiert ein starker Wasserfluß vom Wirt zum Parasiten und so eine hohe Wassernachfrage durch die Wirtspflanzen in den Töpfen. Doch auch unter diesen günstigen Wachstumsbedingungen kam es längst nicht in jedem Versuchstopf zur Entwicklung von einer oder mehreren *Striga*-Pflanzen. Zudem traten Fälle auf, wo es schon bei kleinen *S. hermonthica*-Pflänzchen, deren Sproß erst wenige Tage oberirdisch sichtbar war, zu einer schwarzen Verfärbung der Blattspitzen kam. Diese Schwarzfärbung breitete sich von den Spitzen auf das gesamte Blatt aus. Der Prozeß begann an der Sproßspitze und setzte sich dann nach unten zur Basis hin fort. Schließlich wurde die gesamte Pflanze welk und vertrocknete. ABBASHER (1994) beschrieb diesen Vorgang als Antwort auf eine Infektion von *Striga* mit dem pathogenen Pilz *Fusarium nygamai*. Eine solche Infektion konnte aber bei den Pflanzen nicht festgestellt werden, zumal dieser Vorgang auch in den sterilen *In vitro*-Kulturen auftrat.

Wahrscheinlich können diese Phänomene auch ganz ohne Pathogeneinwirkung beobachtet werden und treten immer dann auf, wenn generell die Lebensbedingungen für *S. hermonthica* suboptimal sind: zum Beispiel wenn die Versorgung mit Nährstoffen oder Phytohormonen nicht zufriedenstellend ist. Ziel der Anzucht war es, möglichst viele *Striga*-Pflanzen für weitere Untersuchungen zu erhalten. Daher wurde geprüft, ob verschiedene Samenvorbehandlungen Einfluß auf die Zahl der entwickelten *Striga*-Pflanzen hatten. So könnte eine Oberflächensterilisation wachstumshemmende Pilzinfektionen vermeiden oder eine Konditionierung den Befallsdruck erhöhen. Ein solcher Zusammenhang bestätigte sich jedoch nicht. Die Topfversuche ergaben keine Korrelation zwischen der Art der Vorbehandlung (unbehandelt, oberflächensterilisiert oder oberflächensterilisiert und konditioniert) und der Infektionseffizienz. Der Aufwand einer Oberflächensterilisation oder Konditionierung kann also entfallen.

#### 5.2.3.2 Cokulturen *Striga hermonthica* – *Sorghum bicolor* in Petrischalen

Für die Untersuchung von Aspekten der Interaktion von *Striga* mit einer Wirtspflanze wie Keimung, Elongation der Keimwurzel, *Attachment*, Haustorienbildung und Sproßentwicklung des Parasiten war ein System erforderlich, in dem sich die Vorgänge optisch gut verfolgen ließen. Versuche mit Cokulturen von *Striga hermonthica* und *Sorghum bicolor* in Petrischalen mit Filtrierpapier oder Agar erfüllten diese Voraussetzung, darüber hinaus gab es keine unbekannten Komponenten in diesem System. Einen Nachteil hatte ein solchermaßen definiertes System: In der natürlichen Umgebung im Boden sind eine Vielzahl von (Mikro-) Organismen vorhanden, die Stoffe modifizieren oder auch in ganz andere Produkte umwandeln können. Ein Beispiel hierfür ist die Bildung von Elicitoren der Phytoalexinsynthese bei Pflanzen: So werden durch bakterielle Enzyme Oligosaccharide aus der pflanzlichen Zellwand freigesetzt, die dann als Elicitoren wirken können. Möglicherweise liegen durch verschiedene Umweltbedingungen in den verschiedenen Ländern bzw. Regionen unterschiedliche Stoffe in den Böden vor, was die Wirt-Parasit-Interaktion beeinflussen könnte. Eine solche Modifikation der Substanzen konnte im artifiziellen Testsystem nicht stattfinden. Die Sorghum-Wurzeln aller getesteten Varietäten (N-13, 555, Framida, IS-9830, Seredo, E-36-1, M-35-1, DS-1195, IS-1037, CSM-209 und CSM-335) induzierten die Keimung von *S. hermonthica*-Samen in den Petrischalentestsystemen. Unterschiede zwischen suszeptiblen und resistenten Varietäten traten hier nicht auf. Verschiedentlich wurde beschrieben, daß das Elongationswachstum der Keimwurzeln einem Chemotropismus

unterliegt und gerichtet auf eine Wirtswurzel hin erfolgt (PEARSON 1913, DIXON und PARKER 1984, RIOPEL *et al.* 1986). Eine solche Orientierung konnte in den Petrischalenversuchen nicht festgestellt werden. Möglicherweise verhinderte der hohe Feuchtegrad in den Testsystemen (Wasserfilm, Wasseragar) die Bildung des für die Ausrichtung nötigen Konzentrationsgradienten. In den Cokulturen von *S. hermonthica* und Wirtspflanzen kam es bei einem Teil der Versuche zur Ausbildung von Härchen im Bereich der Keimwurzelspitzen von *Striga*. Die Härchenbildung wird meist im Zusammenhang mit der Induktion der Haustorialentwicklung gesehen (Kap. 5.2.2). Keine oder weniger Härchen an den *Striga*-Keimwurzeln könnten so ein Hinweis auf die Existenz eines Resistenzfaktors der Wirtspflanze sein. Wird die Haustorienbildung nicht oder nur in geringerer Zahl als bei suszeptiblen Pflanzen induziert, wird die Haustorialentwicklung durch die Wirtspflanze gestört oder verhindert, so kann *Striga* die potentielle Wirtspflanze nicht befallen oder nur mit zahlenmäßig geringerem Erfolg. In den Versuchen zeigte aber keine Sorghum-Varietät einen von den anderen Varietäten abweichenden Einfluß auf *S. hermonthica*. Im Gegensatz zu den Topfversuchen im Gewächshaus bei denen *Striga*-Pflanzen auf Wirtspflanzen angezogen werden konnten, gelang es in den Cokulturen in Petrischalen nur in einem Fall, die Etablierung eines Haustoriums und die weitere Entwicklung von *S. hermonthica* mit der Ausbildung eines Sprosses zu beobachten. In diesem Experiment wurde *S. hermonthica* der Herkunft Mali 95 eingesetzt. Der Petrischalenboden war mit Cellulose-Filterpapier ausgelegt. Überraschenderweise handelte es sich bei der Wirtspflanze im Versuch nicht etwa um eine suszeptible Sorghum-Varietät, sondern um eine Pflanze der als resistent eingestuften Varietät N-13. Als Grundlage der Resistenz von N-13 werden im allgemeinen mechanische Resistenzfaktoren angenommen (siehe Kap. 5.1.3). Daher sollte ein Befall mit *S. hermonthica* eigentlich ausgeschlossen sein. Der Umstand, daß N-13 dennoch befallen werden konnte, kann verschiedene Ursachen haben: a) Die mechanische Resistenz ist nicht vollkommen und kann durchaus durchbrochen werden, b) die Resistenz besteht nicht gegenüber dem eingesetzten *S. hermonthica*-Biotyp (siehe Kap. 5.3.3) oder c) die Resistenz der Varietät N-13 beruht nicht wie angenommen auf mechanischen, sondern auf anderen Faktoren, deren Resistenzwirkung im Testsystem nicht zum Tragen kam. Zwei Wochen nach der Sproßbildung verfärbte sich der zunächst grüne, rund 1 cm große *S. hermonthica*-Sproß plötzlich schwarz und starb ab. Möglicherweise war die Versorgung mit Nährstoffen oder Phytohormonen durch den Wirt im Petrischalensystem gestört und für die weitere Entwicklung nicht ausreichend.

### 5.2.3.3 In vitro-Kulturen von *Striga hermonthica*

*In vitro*-Kulturen von *Striga hermonthica* werden für alle Experimente benötigt, bei denen Gewebe- und Zellkulturen oder das Vorhandensein definierter Klone Voraussetzung sind. So können *Striga*-Zellkultur-Testsysteme entwickelt werden, um z. B. die Wirkung von Herbiziden, Phytotoxinen oder Phytoalexinen zu testen. *Striga*-Klone können bei der Evaluation der Resistenz von „Nicht-Wirtspflanzen“ und bei Studien zu Wechselwirkungen zwischen Wirt und Parasit eingesetzt werden. Auch kann die aus *In vitro*-Pflanzen isolierte DNA für genetische Untersuchungen und Transformationsexperimente verwendet werden, ohne *S. hermonthica*-Pflanzen z. B. im Gewächshaus anziehen zu müssen. Die Etablierung von *In vitro*-Kulturen verschiedener *S. hermonthica*-Herkünfte gelang mittels zweier unterschiedlicher Methoden: Beim ersten Verfahren, der vegetativen Vermehrung über Achselknospen, wurden Sproßabschnitte von Gewächshauspflanzen verwendet. Die Explantate wurden oberflächensterilisiert und anschließend auf MS-Nährmedium mit Phytohormonzusätzen überführt. Die beste Regeneration mit Entwicklung eines Sprosses wurde unter Zusatz der höchsten getesteten Konzentrationen von Gibberellinsäure (GA<sub>3</sub>) und Indoleessigsäure (IES) erzielt: 2 ppm GA<sub>3</sub> und 0,1 ppm IES. Die Oberflächensterilisation mit Natriumhypochlorit und 70%igem Ethanol erlaubte es nicht, unter Beibehaltung der Vitalität der Achselknospen, die Sproßabschnitte ausreichend von Keimen zu befreien, so daß es sehr häufig zur Kontamination mit Bakterien und Pilzen auf dem Kulturmedium kam. Somit ist die Anlage von Gewebekulturen unter Verwendung von Sproßexplantaten prinzipiell zwar möglich, doch bietet das zweite getestete Verfahren eine zuverlässigere Alternative. Bei diesem Verfahren wurden als Ausgangsmaterial nicht Sproßabschnitte, sondern Samen verwendet. Diese ließen sich erfolgreich oberflächensterilisieren, unter Erhalt einer guten Keimungsrate. Eine Kontamination in den Petrischalen trat relativ selten auf. Die Induktion der Keimung gelang in Cokulturen sowohl mit frischen Wurzeln von *Sorghum bicolor* (ganze Pflanzen, Wurzeln im Medium) als auch mit Wurzelteilen von Süßkartoffeln (*Ipomoea batatas*), die dem MS-Medium beigegeben worden waren. Letzteres war insoweit überraschend, da Süßkartoffeln zu den Dikotyledonen zählen. Dikotyledonen gehören nicht zu den Wirten von *S. hermonthica*. Verschiedene zweikeimblättrige Pflanzen werden aber von *S. gesneroides* befallen. Eine Wirtsspezifisierung in Mono- und Dikotyledonen aufgrund der Keimungsinduktion findet in den *In vitro*-Kulturen von *S. hermonthica* demnach nicht statt. Da nicht immer frisches Pflanzenmaterial von Sorghum oder Süßkartoffel zur Verfügung steht und die Keimungsinduktion von *S. hermonthica* unabhängig von weiteren Organismen erfolgen sollte, wurde nach (synthetischen) Induktoren gesucht, deren Handhabung auch in

Bezug auf Lagerung und Anwendung einfacher ist. Das Phytohormon GA<sub>3</sub> wurde in der vegetativen Vermehrung zur Regeneration von *S. hermonthica*-Pflanzen aus Achselknospen verwendet (s. o.), und es induzierte auch die Keimung der Samen von *Orobanch*e (SAHAI und SHIVANNA 1982) und *S. angustifolia* (WORSHAM 1987). Die Keimung von *S. hermonthica*-Samen jedoch wurde in den Experimenten nicht induziert. Mit dem Keimungsstimulans GR 24 ist die Induktion der Keimung zwar möglich, eine Weiterentwicklung zu Pflanzen fand aber nicht statt. Den besten Erfolg ergab der Einsatz von Zeatin-ribosid. Mit der Zugabe von 0,5 ppm Zeatin-ribosid zum MS-Kulturmedium konnte bei zuverlässiger Reproduzierbarkeit die Keimung der *S. hermonthica*-Samen induziert werden, und es gelang, kleine Pflänzchen *in vitro* heranzuziehen. Später konnten diese Pflanzen dann auf MS-Medium kultiviert werden, wobei sie eine maximale Sproßhöhe von rund 10 cm erreichten. Ein weiteres Längenwachstum ließen die verwendeten Kulturgefäße (Magenta) nicht zu. Eine Blütenbildung setzte nicht ein. Die Pflänzchen zeigten eine geringe Wurzelbildung. Es wurden entweder nur Wurzelansätze oder aber kleine, fadenförmige Wurzeln ohne größere Verzweigungen ausgebildet. Ein Umstand der nicht überraschen kann, wenn man sich die Verhältnisse in der Natur vergegenwärtigt. *S. hermonthica* bildet im natürlichen Parasit-Wirt-System zuerst auch keine Wurzeln sondern nur ein Primärhaustorium aus. Erst später werden von der Sproßbasis aus Adventivwurzeln entwickelt, die Sekundärhaustorien etablieren können. Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Pflanzen, die sich aus den Samen entwickelt hatten, problemlos über längere Zeit vermehrt werden. Der Versuch wurde nach mehr als 15 Monaten beendet, ohne daß die Pflanzen an Vitalität verloren hätten. Erfolgreich angewandt wurde das Kultivierungsverfahren auf *S. hermonthica*-Samen der Herkünfte Mali 95, Mali 95 auf Sorghum, Mali 95 auf Millet, Kenia 94 und Kenia 96. Auch auf alle anderen *S. hermonthica*-Herkünfte sollte die Methode übertragbar sein. Somit konnte ein universelles Verfahren etabliert werden, das es zuverlässig ermöglicht, *S. hermonthica*-Pflanzen aus unterschiedlichen Populationen ohne Wirtspflanzen und ohne Exsudate *in vitro* zu kultivieren. In dieser Arbeit wurde aus *In vitro*-Pflanzen isolierte DNA in genetischen Untersuchungen zur Charakterisierung der Verwandtschaftsverhältnisse der verschiedenen Herkünfte eingesetzt.

#### 5.2.3.4 Akkumulation der von *Striga hermonthica* abgegebenen Stoffe im Nährmedium

*In vitro*-Pflanzen von *Striga hermonthica* auf MS-Medium gaben rosa-violett gefärbte Stoffe ins Nährmedium ab. Diese Stoffe akkumulierten im Medium, und nach drei bis vier Wochen

besaß das Gel eine lila bis braune Farbe. Verblieben die *In vitro*-Pflanzen auf diesem Medium, so verfärbten sie sich alle kollektiv schwarz und starben ab. Deshalb wurden die Pflanzen alle vier Wochen auf frisches Medium umgesetzt. Möglicherweise spielen diese Stoffe auch bei der Interaktion von Wirt und Parasit eine physiologische Rolle. Wenn diese Stoffe tatsächlich Auslöser für das Absterben der *In vitro*-Pflanzen sind, könnte man sich diesen Umstand vielleicht auch in einer *Striga*-Bekämpfungsstrategie zunutze machen. Leider gelang es aber nicht, die Stoffe aus der Gelmatrix heraus zu isolieren. Versuche durch Gabe von Alkali oder durch Ansäuern eine farbliche Veränderung (Redoxreaktion) und damit einen gewissen Hinweis auf die Stoffklasse zu erhalten, führten zu keinem Erfolg.

### 5.3 Morphologische Charakterisierung und genetischer Fingerabdruck von *Striga hermonthica*

Mehrere neue *Sorghum bicolor*-Varietäten, die im Rahmen des *Restricted Core Project* „*Striga* Resistance in Sorghum“ von ICRISAT und den Universitäten Hohenheim und Tübingen gezüchtet worden waren, wurden in verschiedenen Regionen Afrikas in Feldversuchen auf ihre Resistenz gegenüber *Striga hermonthica* getestet. Die Versuche fanden in den westafrikanischen Ländern Mali und Niger sowie im ostafrikanischen Kenia statt. Dabei ergab sich folgendes Bild: Sorghum-Varietäten, die in Mali einen signifikant geringeren Befall mit *S. hermonthica* aufwiesen, waren dagegen in Kenia stark befallen<sup>10</sup>. Dieses Versuchsergebnis könnte z. B. in den unterschiedlichen Umweltbedingungen begründet liegen. Möglich ist allerdings auch, daß verschiedene Formen – Biotypen, Unterarten von *S. hermonthica* oder sogar verschiedene *Striga*-Arten in den Regionen existieren, welche unterschiedliche Wirtsspezifitäten oder auch eine unterschiedliche Aggressivität im Wirtsbefall besitzen könnten. Das Wissen darüber, ob verschiedene *Striga*-Formen in den Regionen präsent sind, ist für die Planung weiterer Züchtungsversuche und für den Feldeinsatz neuer Sorghum-Varietäten von größtem Interesse. Zur taxonomischen Einordnung der *S. hermonthica*-Pflanzen, die aus Samen verschiedener Herkünfte angezogen worden waren, wurden verschiedene Merkmale bestimmt. Bei zwei Herkünften, eine aus West-, die andere aus Ostafrika, wurden die Blüten auf ihre morphologischen Merkmale untersucht. Für vier Herkünfte wurden die Samenschalen unter dem Rasterelektronenmikroskop (REM) auf ihre morphologischen Charakteristika untersucht. Zur

---

<sup>10</sup> K. Wegmann, Institut für Pflanzenbiochemie, Universität Tübingen, persönliche Mitteilung.

Bestimmung der Abstammungsverhältnisse auf genetischer Ebene wurde die bisher umfassendste Untersuchung auf Grundlage der Erbsubstanz (DNA) bei *S. hermonthica* durchgeführt. Methoden, die auf der DNA-Analyse basieren, haben Vorteile gegenüber der für taxonomische Untersuchungen ebenfalls häufig angewandten Isoenzymanalyse: Die Isoenzymanalyse kann nur Unterschiede aufzeigen, die sich in strukturellen Merkmalen der Proteine niederschlagen. Sind diese Proteine aufgrund ihrer enzymatischen Funktion für den Organismus wichtig, so wird die Zahl der Mutationen, die Bestand haben, relativ gering sein. Untersuchungsmethoden auf der Basis der DNA-Analyse, die das gesamte Genom abdecken, können dagegen auch Unterschiede in den nicht-kodierenden Sequenzabschnitten detektieren. Veränderungen in diesen Bereichen unterliegen einem geringeren Evolutionsdruck – Mutationen können hier häufiger auftreten. Eine weitere Schwierigkeit bei der Isoenzymanalyse ist, daß sich das Proteinexpressionsmuster mit den verschiedenen Lebensstadien einer Pflanze ändert, was bei vergleichenden Untersuchungen immer berücksichtigt werden muß. Zur Untersuchung der Gesamt-DNA fanden zwei moderne Verfahren der Genomanalyse Anwendung. Ein sogenannter „genetischer Fingerabdruck“ wurde von 168 Pflanzen aus 21 verschiedenen Herkunftsn mit Hilfe der RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)-PCR ermittelt. Die RAPD-PCR ist ein Verfahren, das die Methodik der Polymerasekettenreaktion (PCR) nutzt. Außerdem wurden Versuche unter Ausnutzung des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) durchgeführt.

### 5.3.1 Morphologie der Blüten und Samen

*Striga hermonthica*-Pflanzen wurden in Zusammenarbeit mit dem Taxonomen Prof. E. S. Teryokhin auf ihre morphologischen Merkmale untersucht. Das Augenmerk lag dabei besonders auf den Blütenmerkmalen. Sie dienten zur taxonomischen Unterscheidung der *S. hermonthica*-Pflanzen der Herkunftsn Mali 95 und Kenia 94. Der Vergleich der beiden Herkunftsn ergab signifikante Unterschiede in Form und Farbe von Calyx und Corolla: Am auffälligsten war die kleinere Blütenform der Herkunftsn Mali 95 gegenüber Kenia 94. Aufgrund der morphologischen Unterschiede ist davon auszugehen, daß es sich bei Pflanzen von *S. hermonthica* aus Mali 95 und aus Kenia 94 zumindest um unterschiedliche (Bio-) Typen von *S. hermonthica* handelt. Teryokhin ist sogar der Ansicht, daß es sich um verschiedene (Unter-) Arten handelt, wenn auch eng miteinander verwandt<sup>11</sup>. Möglicherweise entspricht diese Einordnung in zwei verschiedene (Unter-) Arten auch der Einteilung von

---

<sup>11</sup> E. S. Teryokhin, Komarov Botanisches Institut, St. Petersburg, Rußland, persönliche Mitteilung, 1997.

HEMSLEY (1906): Er beschrieb neben *S. hermonthica* auch eine weitere mit ihr sehr verwandte Art: *Striga senegalensis*. *S. senegalensis* zeichnete sich danach besonders durch die kleinere Blütenform verglichen mit *S. hermonthica* aus. Herbarbelege wiesen ein Vorkommen besonders im Bereich des westlichen Afrikas aus.

Die Untersuchungen unter dem REM ergaben keine signifikanten Unterschiede in der Struktur der Samenschale beim Vergleich der ausgewählten Herkünfte aus Mali, Kenia und dem Sudan. Betrachtete man die Samen aus einer Samencharge, das heißt von identischem Herkunftsort und Erntejahr, so konnte man schon da erhebliche Unterschiede in der Gestalt der einzelnen Samen feststellen. Einzig eine gewisse Tendenz zu länger-gestreckten Segmenten auf der Oberfläche ließ sich bei den Samen der Herkünfte Kenia 94 und Sudan 93 gegenüber Mali 95 (auf Sorghum bzw. Millet) bemerken. Diese Unterschiede waren aber nicht so eindeutig, als daß man sie als charakteristisches Unterscheidungsmerkmal heranziehen hätte können.

### **5.3.2 Molekularbiologische Methoden**

#### **5.3.2.1 DNA-Isolierung**

Zur genetischen Untersuchung wurde die Gesamt-DNA aus dem Blattmaterial von *Striga hermonthica*-Pflanzen isoliert. Die Mehrzahl der hierfür benötigten *Striga*-Pflanzen wurde auf *Sorghum bicolor*-Wirtspflanzen im Gewächshaus angezogen. Daneben wurde auch Material von einigen *In vitro*-Pflanzen verwendet. Die *S. hermonthica*-Samen für die Anzucht stammten von 21 Herkünften aus sieben afrikanischen Ländern (Ghana, Kenia, Mali, Niger, Sudan, Tansania, Togo) und dem Jemen, z. T. von verschiedenen Orten eines Landes, aus unterschiedlichen Erntejahren und von *Striga*-Pflanzen, die auf unterschiedlichen Wirtspflanzen gewachsen waren. Die Gesamt-DNA wurde jeweils aus den Blättern von mehr als 200 einzelnen *S. hermonthica*-Pflanzen isoliert. Dabei wurden immer nur so viele Blätter vom Sproß entfernt, daß der Fortbestand der Pflanze gewährleistet blieb. Die Ausbeuten variierten je nach einzelner Pflanze (Größe und Statur) zwischen 60 und 3000 µg DNA. Konnten bei einer Pflanze nur geringe DNA-Mengen isoliert werden, so wurde, wenn noch genügend neues Blattmaterial nachwuchs, die DNA-Isolierung wiederholt. Einige DNA-Präparationen besaßen eine lila Färbung. Der Farbton ähnelte der Färbung der Medien in den *In vitro*-Kulturen. Die Färbung hatte jedoch keinen Einfluß auf die weiteren Untersuchungen. Ein Maß für die Qualität der DNA-Proben ist der photometrisch bestimmte Quotient  $E_{260} / E_{280}$ . Reine Präparationen von DNA besitzen ein Verhältnis von 1,8–2,0. Liegt eine



Kontamination mit Proteinen oder Phenol vor, so liegen die Werte niedriger als 1,8. Werte höher als 2,0 deuten auf ein hohes Verhältnis RNA/DNA hin. Die meisten DNA-Präparationen von *S. hermonthica* besaßen eine hohe Reinheit mit einem Quotienten zwischen 1,9 und 2,0. Für die RAPD-PCR-Untersuchungen wurde die isolierte DNA zusätzlich mit RNase A verdaut, um in den Präparationen vorhandene RNA zu eliminieren. RNA würde der Polymerase in der PCR ebenfalls als Matrize dienen und damit das Bandenmuster beeinflussen. Durch die nach dem RNase A-Verdau nötige erneute Fällung verringerte sich die für die Untersuchungen zur Verfügung stehende DNA-Menge nochmals.

#### 5.3.2.2 RFLP-Analysen

RFLP-Analysen wurden für *Striga hermonthica*-Pflanzen der Herkünfte Mali 93 und 95 sowie Kenia 94 durchgeführt. Die DNA wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI, DraI, EcoRI, EcoRV, HindIII, KpnI und PstI verdaut. Als Sonden wurden die Oligonukleotidsonden (GATA)<sub>4</sub>, (GACA)<sub>4</sub> und (GTG)<sub>5</sub> sowie die rDNA-Gensonden pRZ 18 und pRZ 25 eingesetzt. Die rDNA-Gensonden pRZ 18 und pRZ 25 enthalten rDNA-Genabschnitte aus Zucchini (*Cucurbita pepo*) und wurden erfolgreich bei der genetischen Charakterisierung von Kartoffel-Arten (*Solanum* spp.) eingesetzt (BORISJUK *et al.* 1994). Bei der Verwendung der rDNA-Gensonden bei *S. hermonthica* traten dagegen keine Polymorphismen auf. Die von diesen Sonden detektierten Genabschnitte kodieren für Komponenten der Ribosomen. Diese Bereiche sind für *S. hermonthica* wohl so essentiell, daß umfangreiche Mutationsereignisse hier keinen Bestand haben. Die Folge waren identische Bandenmuster für alle DNA-Proben. Anders bei den Oligonukleotidsonden: Hier traten sehr viele Polymorphismen auf. Die sich wiederholenden Sequenzmotive (GATA)<sub>4</sub>, (GACA)<sub>4</sub> und (GTG)<sub>5</sub> hybridisieren mit repetitiven DNA-Bereichen des Genoms, welche als SSR (engl. *Simple Sequence Repeats*, einfache Sequenzwiederholungen) oder Mikrosatelliten bezeichnet werden. Die SSRs sind bei Eukaryonten über das gesamte Genom verstreut und unterliegen einer Vielzahl von Mutationsereignissen. Die Bandenmuster, die mit den Sonden (GATA)<sub>4</sub> und (GACA)<sub>4</sub> erhalten wurden, waren identisch. Offenbar spielt es bei der Detektion keine Rolle, welche Pyrimidinbase in der Sonde eingebaut ist. Leider ließen sich keine Bandenmuster identifizieren, die spezifisch für einen bestimmten Genotyp, eine bestimmte *Striga*-Herkunft gewesen wären. Unterschiede in den Bandenmustern traten auch beim Vergleich der DNA von Pflanzen gleicher Herkunft auf. Die verwendeten Kombinationen aus Restriktionsenzymen und Sonden ermöglichten also eine sehr genaue Unterscheidung auf

genetischer Ebene. Unterschiede im Genom wurden bis zur Ebene des einzelnen Individuums aufgelöst. Diese Auflösung ist aber zu fein für die Ermittlung der Abstammungsverhältnisse auf der Ebene der Herkünfte. Die RFLP-Analyse ist somit unter diesen Bedingungen für die phylogenetische Auswertung der *S. hermonthica*-DNA-Proben nicht geeignet. Auch aus einem anderen Grund erschien die Methodik der RFLP für die Untersuchungen an *S. hermonthica* nicht vorteilhaft. Die RFLP-Analysen benötigten für jeden Ansatz eine große Menge an DNA, rund 20 µg. Die DNA-Isolierung erbrachte aber für bestimmte Genotypen sehr geringe Ausbeuten von z. T. nur 60 µg DNA (siehe Kap. 5.3.2.1). Damit war das nötige Versuchsprogramm an verschiedenen Kombinationen und Wiederholungen nicht durchzuführen. Dagegen kommt das Verfahren der RAPD-PCR mit wesentlich geringeren DNA-Mengen aus. Hier reichen schon 80 ng für einen Analysendurchgang, also nur ein 250stel dessen, was für die RFLP benötigt wird. Daher wurde für die umfassende phylogenetische Untersuchung aller *S. hermonthica*-DNA-Proben das RAPD-PCR-Verfahren gewählt.

#### 5.3.2.3 RAPD-PCR

Im Rahmen der RAPD-PCR-Analysen wurden insgesamt 168 DNA-Proben von einzelnen *S. hermonthica*-Pflanzen der verschiedenen Herkünfte untersucht. Für die Durchführung der PCR-Läufe wurde ein Protokoll entwickelt, das Elemente aus verschiedenen bestehenden Protokollen vereinigt, die bei der Untersuchung von *Orobanch*e spp. erfolgreich waren (KATZIR *et al.* 1996, PARAN *et al.* 1997, ZEID *et al.* 1997). *Orobanch*e ist ebenfalls ein Wurzelparasit und nahe mit *Striga* verwandt. Die optimierten Reaktionsbedingungen ermöglichten eine zuverlässige Amplifikation von DNA-Abschnitten des *S. hermonthica*-Genoms. Die PCR-Läufe wurden mit fünfzehn verschiedenen 10mer-Primern durchgeführt. Es wurden hierfür speziell Primer ausgesucht, die bei RAPD-PCR-Untersuchungen von *Orobanch*e-Arten zu Polymorphismen geführt hatten. Auch bei *S. hermonthica* ließen sich diese Primer in Verbindung mit dem gewählten PCR-Protokoll erfolgreich einsetzen. Mit allen fünfzehn Primern wurden Amplifikationsprodukte, d. h. Banden, erhalten. Dies ist ein hervorragendes Ergebnis: Werden die Primer dagegen zufällig gewählt, ein durchaus übliches Verfahren, zeigen oft nur 5 % oder weniger der Primer Amplifikationsprodukte. Polymorphismen mit charakteristischen und reproduzierbaren Banden ergaben sich für sieben der fünfzehn Primer. Für die Identifizierung und Einordnung der Genotypen wäre es der Idealfall, wenn Banden erhalten werden, die spezifisch für die Genotypen einer bestimmten

Herkunft sind. So ließen sich Genotypen durch einen Test auf das Vorhandensein dieser spezifischen Bande sehr schnell und einfach auf ihre Herkunft untersuchen. Eine solche spezifische Bande konnte nur für eine Herkunft identifiziert werden: Bei der Verwendung des Primers STR-R13 wurde die Bande 13/3 nur bei Genotypen der Herkunft Jemen, 1988 gefunden. Doch ließen sich Aussagen über die Herkunft eines jeden Genotyps auch aus einem sogenannten „genetischen Fingerabdruck“ treffen. Dabei wurde für jeden Genotyp überprüft, welche der 36 für die Analyse ausgewählten RAPD-Banden vorhanden waren und welche nicht. Aus diesen Bandenmustern konnten in anschließenden phylogenetischen Untersuchungen Abstammungsverhältnisse durch mathematische Verfahren berechnet werden. Dabei wurde vereinfachend davon ausgegangen, daß es sich bei den typischen Banden mit identischem Molekulargewicht, die für einen Primer erhalten worden waren, tatsächlich um homologe Genabschnitte handelte. Überprüft werden könnte diese Annahme noch durch *Southern Blotting*, Sequenzieren oder einen zusätzlichen Restriktionsverdau der PCR-Produkte analog dem *CAPS* (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*)-Verfahren.

#### 5.3.2.4 Phylogenetische Auswertung

##### 5.3.2.4.1 *Dendrogramme basierend auf Einzelproben*

Mit dem Computerprogramm *PAUP\** wurde ein Dendrogramm nach *UPGMA* (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*) auf der Grundlage der Daten der einzelnen Genotypen erstellt. Der erhaltene Baum wurde anschließend mittels *Bootstrap*-Analyse auf seine Güte hin überprüft. Es wurde hierbei eine 50%ige Konsensusbedingung eingestellt, und es wurden 100 Replikationen gerechnet. Die *Bootstrap*-Analyse zeigt die Gliederung in zwei große, monophyletische Zweige oder (engl.) *clades*: Der eine Zweig mit einem *Bootstrap*-Wert von 85 umfaßt die Proben der Herkünfte aus dem westlichen Afrika (Ghana, Mali, Niger und Togo), der andere mit dem *Bootstrap*-Wert von 90 die Herkünfte aus dem östlichen Teil (Kenia, Sudan, Tansania) und Jemen, jeweils mit den entsprechenden Untergruppierungen der verschiedenen Orte und Erntejahre. Innerhalb der zwei Hauptgruppen sind nur nicht signifikante Aufspaltungen mit wesentlich niedrigeren *Bootstrap*-Werten (Werte zwischen 51 und 74) zu finden. HILLIS und BULL (1993) kamen bei ihren Untersuchungen zum Schluß, daß man bei *Bootstrap*-Werte  $\geq 70$  davon ausgehen kann, daß mit einer Wahrscheinlichkeit  $\geq 95\%$  die richtigen phylogenetischen Verhältnisse gefunden worden sind. So kann es als sehr sicher gelten, daß die Aufspaltung in eine „Westgruppe“ (*Bootstrap*-Wert = 85) und eine „Ostgruppe“ (*Bootstrap*-Wert = 90) die tatsächlichen phylogenetischen Verhältnisse

widerspiegelt. Das andere Dendrogramm wurde unter Verwendung des Verfahrens *Maximum Parsimony* (MP) erstellt. Aus den 2000 erhaltenen Bäumen wurde ein 50 %-Konsensusbaum ermittelt. Dieser Baum gibt nur die Topologie wieder. Er zeigt keine konkreten Längen in Bezug auf genetische Unterschiede. Das Dendrogramm zeigt eine Auftrennung in zwei große, monophyletische Zweige. Diese Aufspaltung ist in allen (100 %) der gerechneten 2000 Einzelbäume vorhanden. Die Genotypen in den Zweigen sind identisch mit den für UPGMA beschriebenen zwei Hauptgruppen. Auch unter Verwendung von MP gibt es also eine klare Auftrennung in eine „West-“ und eine „Ostgruppe“.

#### 5.3.2.4.2 Untersuchungen auf Populationsebene

Da sich in den vorangegangenen Untersuchungen zeigte, daß die einzelnen DNA-Proben gleicher Herkunft eine hohe Verwandtschaft zeigten, war es gerechtfertigt, sie für die weitere Auswertung zu Populationen zusammenzufassen. Zur Untersuchung der genetischen Variabilität innerhalb der Populationen wurde die Gendiversität  $h$  nach NEI (1973) bestimmt. Je größer der Wert  $h$  ist, desto genetisch heterogener ist die jeweilige Population. Die ermittelten Gendiversitäten reichen von 0,052 (Naes/Ghana, 1986 und Kenia, 1992) bis zum höchsten Wert von 0,170 (Savanne/Togo, 1988). Ein Trend zu höherer oder niedrigerer Gendiversität für bestimmte Regionen ist nicht festzustellen. Auch liegt kein Zusammenhang zwischen der untersuchten Populationsgröße und dem ermittelten Wert für die Gendiversität vor. Vergleicht man die Proben aus einer Region untereinander, so fällt auf, daß in der Mehrzahl der Fälle die Gendiversität zunimmt, je jünger das Erntejahr der Probe ist. Im Verlauf der Evolution nimmt also die genetische Vielfalt von *S. hermonthica* in den Populationen zu. Dies steht in Einklang mit der generellen Vorstellung, daß die Fortpflanzung über Fremdbefruchtung, wie sie bei *S. hermonthica* stattfindet, zu höherer genetischer Vielfalt führt. Die genetischen Distanzen zwischen den verschiedenen *S. hermonthica*-Populationen wurden nach dem Verfahren ohne zusätzliche Randbedingungen nach NEI (1978) berechnet. Basierend auf diesen Distanzwerten wurde mit dem Verfahren nach UPGMA ein Dendrogramm erstellt, das die Verwandtschaftsverhältnisse der Populationen zueinander darstellt. Auch dieses Dendrogramm zeigt die deutliche Aufspaltung in zwei Gruppen: Die „Westgruppe“ mit einem Distanzwert von 19,055 umfaßt, wie bereits für die auf Einzelproben basierenden Dendrogramme beschrieben, die Populationen aus Ghana, Mali, Niger und Togo. Die „Ostgruppe“ mit 17,438 für die genetische Distanz beinhaltet Populationen aus Kenia, Sudan, Tansania und Jemen. Die genetischen Distanzen innerhalb der zwei Hauptgruppen lassen keine weitere Struktur der Verwandtschaftsverhältnisse erkennen.

#### 5.3.2.4.3 Gesamtbetrachtung der phylogenetischen Untersuchungen

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß alle verwendeten Verfahren zur phylogenetischen Auswertung der RAPD-PCR-Daten, auf Einzelproben wie auch auf Populationsdaten basierend, die gleiche signifikante Aufspaltung in zwei monophyletische Gruppen zeigen. Somit kann es als sicher angesehen werden, daß für *Striga hermonthica* in Afrika (zumindest) zwei große Genpools existieren. Der eine, als „Westgruppe“ bezeichnet, beinhaltet Genotypen deren Herkunft mehr dem westlichen Teil Afrikas zuzuordnen ist: Das sind in dieser Arbeit Herkünfte aus Ghana, Mali, Niger und Togo. Die „Ostgruppe“ umfaßt Genotypen aus dem östlichen Afrika (Kenia, Sudan, Tansania) und auch die aus Jemen.

#### 5.3.3 Taxonomische Einordnung der Herkünfte

Sowohl die morphologischen Untersuchungen der Blütenmerkmale als auch die genetischen Analysen auf der Grundlage der RAPD-PCR-Daten lassen den Schluß zu, daß in Afrika (zumindest) zwei unterschiedliche Formen von „*Striga hermonthica*“ existieren. Wie diese taxonomisch einzuordnen sind, ist noch unklar. So könnte es sich bei den unterschiedlichen Formen handeln um

- a) Biotypen unterhalb des Artbegriffs,
- b) Unterarten von *Striga hermonthica* oder
- c) zwei verschiedene Arten: *Striga hermonthica* und eine nahe mit ihr verwandte.

Möglicherweise könnte diese nahe mit *S. hermonthica* verwandte Art der von HEMSLEY (1906) beschriebenen und in der heutigen Taxonomie in Vergessenheit geratenen *Striga senegalensis* entsprechen.

Aufgrund dieser Ergebnisse läßt sich der eingangs beschriebene unterschiedlich starke Befall der gleichen *Sorghum bicolor*-Varietäten in den verschiedenen Regionen erklären: Sorghum-Pflanzen werden in Mali im westlichen Afrika von genetisch anderen *Striga* (*hermonthica* ?)-Formen bzw. -Biotypen attackiert als in Kenia im Osten Afrikas. Gegenüber diesen genetisch unterschiedlichen Formen besitzen die Sorghum-Varietäten sehr wahrscheinlich eine unterschiedlich starke Resistenz. Die Existenz verschiedener Genpools von *Striga hermonthica* bzw. das Auftreten verwandter (Unter-) Arten ist ein Umstand, der bei der Diskussion von Resistenz in Zukunft immer mitberücksichtigt werden muß.

Ziel weitergehender Arbeiten sollte es sein, eine Übersicht der geographischen Verbreitung der verschiedenen *S. hermonthica*-Formen bzw. *Striga*-Arten in Afrika und weltweit zu

erstellen. Die in dieser Arbeit etablierten Methoden auf Basis der RAPD-PCR stellen hierfür ein geeignetes Instrumentarium zur Verfügung.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Züchtung *Striga*-resistenter Sorghum-Varietäten steht im Fokus der internationalen Forschung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden *Sorghum bicolor*-Varietäten auf mögliche Resistenzmechanismen gegen *Striga hermonthica* untersucht. Exoenzyme der Parasiten sind nötig für das Eindringen des Haustoriums in das Wirtsgewebe, um den Anschluß an das Gefäßsystem des Wirts herzustellen. Stoffe, die vom Wirt abgegeben werden, könnten die Aktivität dieser Enzyme hemmen. Exsudate resistenter Sorghum-Varietäten zeigten aber keinen von den suszeptiblen Varietäten signifikant abweichenden Einfluß auf die Aktivitäten der getesteten Enzyme. Die Produktion von Phytoalexinen durch die potentielle Wirtspflanze kann den Befall durch Parasiten verhindern. Das Vorkommen von Phytoalexinen in den Blättern bestimmter Sorghum-Varietäten ist zwar bekannt, in den Wurzeln der (resistenten) Sorghum-Pflanzen konnten Phytoalexine jedoch nicht nachgewiesen werden. Ein mechanischer Resistenzfaktor ist die Modifikation der Zellwände. Die Einlagerung von Lignin könnte eine Barriere bilden, die das Eindringen der Haustorien verhindert. Kernspinresonanz-Untersuchungen zeigten keine Unterschiede im Lignin-Gehalt junger Sorghum-Wurzeln resistenter Varietäten verglichen mit denen suszeptibler. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung mit anschließender Bioautographie der Sorghum-Wurzelexsudate zeigte das Vorhandensein unterschiedlicher Stoffe mit keimungsinduzierender Wirkung in den verschiedenen Sorghum-Varietäten. Die unterschiedliche Zusammensetzung des Bouquets der Keimungsstimulanzien ist eine mögliche Erklärung für den verschieden starken Befall mit *S. hermonthica* im Feld. Die Rolle eines Haustorialinduktors erschien in den Versuchen unklar. Die durchgeführten Untersuchungen konnten die Einleitung der an die Keimung der *Striga*-Samen anschließenden Entwicklungsschritte durch einen solchen Induktor nicht bestätigen. Die Existenz eines Resistenzmechanismus im Zusammenhang mit der Haustorialinduktion ist höchst unwahrscheinlich.

Neben der klassischen Anzucht auf Wirtspflanzen im Topfversuch gelang es im Rahmen dieser Arbeit auch, ein Verfahren zu etablieren, welches es ermöglichte, *S. hermonthica* unter völligem Verzicht auf Stoffe von Wirtspflanzen *in vitro* anzuziehen. Das Phytohormon Zeatin-ribosid induzierte die Keimung der Samen und stimulierte das weitere Wachstum. Die so erhaltenen Klone konnten auf MS-Medium weitervermehrt werden. Aus *In vitro*-Pflanzen isolierte DNA wurde bei der Erstellung eines genetischen Fingerabdrucks von *S. hermonthica* verschiedener Herkünfte eingesetzt.

*S. hermonthica*-Pflanzen aus Mali und Kenia wurden anhand der Blütenmerkmale charakterisiert. Die Untersuchung ergab klare morphologische Unterschiede zwischen der west- und der ostafrikanischen Herkunft. Ein genetischer Fingerabdruck von 168 Pflanzen aus 21 Herkünften verschiedener afrikanischer Länder und dem Jemen wurde mittels RAPD-PCR-Analyse erstellt. Die phylogenetische Auswertung unter Verwendung der mathematischen Verfahren nach *UPGMA* (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*) und *Maximum Parsimony* (MP) ergaben eine klare Aufspaltung in zwei monophyletische Gruppen. Die eine Gruppe umfaßt die Herkünfte aus dem westlichen, die andere die aus dem östlichen Afrika und Jemen. Somit lassen sowohl die morphologischen Untersuchungen als auch die genetischen Analysen übereinstimmend den Schluß zu, daß in Afrika (zumindest) zwei Formen von „*Striga hermonthica*“ mit unterschiedlicher geographischer Verbreitung vorkommen. Deren taxonomische Einordnung ist allerdings noch unklar. Möglicherweise könnte es sich bei der zweiten Form um die nahe mit *S. hermonthica* verwandte Art *Striga senegalensis* handeln, die in „Flora of Tropical Africa“ (HEMSLEY 1906) noch als eigenständige Art aufgeführt worden war, in der heutigen Taxonomie aber in Vergessenheit geraten ist.



## 7 ANHANG

Die Tab. 7-2 bis 7-7 zeigen die Ergebnisse der RAPD-Bandenauswertung. Wurde für einen Genotyp eine der für die Analyse ausgewählten Banden gefunden, so ist in der Matrix für diese Bande eine „1“ eingetragen, beim Fehlen der Bande dagegen eine „0“. Konnte für eine Genotyp-Primer-Kombination auch nach mehreren Wiederholungen kein eindeutiges Ergebnis erhalten werden, ist dies mit einem „-“ vermerkt. Die verwendeten Abkürzungen für die Herkünfte erläutert Tab. 7-1.

Tab. 7-1: DNA-Proben aus Blattmaterial von *Striga hermonthica* (Del.) Benth. für die RAPD-PCR – Beschreibungen der Herkünfte (Angaben soweit bekannt).

| Herkunft      | Land     | Ort/Bezeichnung | Wirt          | Erntejahr | Zusatz          |
|---------------|----------|-----------------|---------------|-----------|-----------------|
| Ghana/Naes86  | Ghana    | Naes            |               | 1986      |                 |
| Ghana91       | Ghana    |                 |               | 1991      |                 |
| Ghana/Novel92 | Ghana    | Novel           |               | 1992      |                 |
| Ghana93       | Ghana    |                 |               | 1993      |                 |
| Kenia92       | Kenia    |                 |               | 1992      |                 |
| Kenia94       | Kenia    |                 |               | 1994      |                 |
| Kenia/K96     | Kenia    | Kisumu          | Sorghum, Mais | 1996      |                 |
| Kenia/K96iv   | Kenia    | Kisumu          | Sorghum, Mais | 1996      | <i>in vitro</i> |
| Kenia/G96     | Kenia    | Kisumu          | Sorghum, Mais | 1996      |                 |
| Mali93        | Mali     | Samanko         |               | 1993      |                 |
| Mali95        | Mali     | Samanko         | Sorghum       | 1995      |                 |
| Mali95iv      | Mali     | Samanko         | Sorghum       | 1995      | <i>in vitro</i> |
| Mali/ZSo95    | Mali     | Cinzana         | Sorghum       | 1995      |                 |
| Mali/ZMill95  | Mali     | Cinzana         | Millet        | 1995      |                 |
| Niger94       | Niger    |                 |               | 1994      |                 |
| Sudan88/89    | Sudan    |                 |               | 1988/89   |                 |
| Sudan93       | Sudan    |                 |               | 1993      |                 |
| Tansania94    | Tansania |                 |               | 1994      |                 |
| Togo/Kava88   | Togo     | Kava            |               | 1988      |                 |
| Togo/Sav88    | Togo     | Savanne         |               | 1988      |                 |
| Jemen88       | Jemen    |                 |               | 1988      |                 |

Tab. 7-2: RAPD-PCR-Bandenauswertung – Teil 1 – Primer 1/1 bis 12/5.

| Genotyp   | Herkunft      | 1/1 | 1/2 | 1/3 | 1/4 | 2/1 | 2/2 | 2/3 | 2/4 | 6/1 | 6/2 | 6/3 | 6/4 | 6/5 | 12/1 | 12/2 | 12/3 | 12/4 | 12/5 |
|-----------|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|
| G/Na/86/1 | Ghana/Naes86  | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| G/Na/86/2 | Ghana/Naes86  | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| G/Na/86/3 | Ghana/Naes86  | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| G/No/92/1 | Ghana/Novel92 | 1   | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| G/No/92/2 | Ghana/Novel92 | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| G/No/92/3 | Ghana/Novel92 | 1   | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| G/No/92/4 | Ghana/Novel92 | 1   | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| G/No/92/5 | Ghana/Novel92 | 1   | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| G/91/1    | Ghana91       | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| G/91/2    | Ghana91       | 1   | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| G/93/1    | Ghana93       | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| G/93/2    | Ghana93       | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| G/93/3    | Ghana93       | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| G/93/4    | Ghana93       | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| G/93/5    | Ghana93       | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| G/93/6    | Ghana93       | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/92/1    | Kenia92       | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/92/2    | Kenia92       | 0   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/92/3    | Kenia92       | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/94/1    | Kenia94       | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/94/2    | Kenia94       | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/94/3    | Kenia94       | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/94/4    | Kenia94       | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    |
| K/94/5    | Kenia94       | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/94/6    | Kenia94       | 0   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 1    | 0    | 0    | 1    |
| K/94/7    | Kenia94       | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/94/8    | Kenia94       | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/94/9    | Kenia94       | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 1    | 0    | 0    | 1    |
| K/94/10   | Kenia94       | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/94/11   | Kenia94       | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/94/12   | Kenia94       | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/94/13   | Kenia94       | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/94/14   | Kenia94       | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 1    | 0    | 0    | 1    |
| K/94/15   | Kenia94       | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/94/16   | Kenia94       | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/94/17   | Kenia94       | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 1    | 0    | 0    | 1    |
| K/94/18   | Kenia94       | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/94/19   | Kenia94       | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/94/20   | Kenia94       | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    |
| K/94/21   | Kenia94       | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/94/22   | Kenia94       | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/94/23   | Kenia94       | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/94/24   | Kenia94       | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/94/25   | Kenia94       | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/94/26   | Kenia94       | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/94/27   | Kenia94       | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/94/28   | Kenia94       | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/K/96/1  | Kenia/K96     | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    |
| K/K/96/2  | Kenia/K96     | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/K/96/3  | Kenia/K96     | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/K/96/4  | Kenia/K96     | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/K/96/5  | Kenia/K96     | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/K/96/6  | Kenia/K96     | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/K/96/7  | Kenia/K96     | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/K/96/8  | Kenia/K96     | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    |
| K/K/96/9  | Kenia/K96     | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/K/96/10 | Kenia/K96     | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/K/96/11 | Kenia/K96     | .   | .   | .   | .   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/K/96/iv | Kenia/K96iv   | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |

Tab. 7-3: RAPD-PCR-Bandenauswertung – Teil 1 – Primer 12/6 bis 15/5.

| 12/6 | 12/7 | 12/8 | 13/1 | 13/2 | 13/3 | 13/4 | 13/5 | 14/1 | 14/2 | 14/3 | 14/4 | 14/5 | 15/1 | 15/2 | 15/3 | 15/4 | 15/5 | Herkunft      | Genotyp   |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|---------------|-----------|
| 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Ghana/Naes86  | G/Na/86/1 |
| 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Ghana/Naes86  | G/Na/86/2 |
| 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Ghana/Naes86  | G/Na/86/3 |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Ghana/Novel92 | G/No/92/1 |
| 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Ghana/Novel92 | G/No/92/2 |
| 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Ghana/Novel92 | G/No/92/3 |
| 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Ghana/Novel92 | G/No/92/4 |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Ghana/Novel92 | G/No/92/5 |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Ghana91       | G/91/1    |
| 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Ghana91       | G/91/2    |
| 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Ghana93       | G/93/1    |
| 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Ghana93       | G/93/2    |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Ghana93       | G/93/3    |
| 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | 1    | Ghana93       | G/93/4    |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Ghana93       | G/93/5    |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Ghana93       | G/93/6    |
| 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 0    | 0    | Kenia92       | K/92/1    |
| 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 0    | 0    | Kenia92       | K/92/2    |
| 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | Kenia92       | K/92/3    |
| 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | Kenia94       | K/94/1    |
| 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | Kenia94       | K/94/2    |
| 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | Kenia94       | K/94/3    |
| 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | Kenia94       | K/94/4    |
| 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | Kenia94       | K/94/5    |
| 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | Kenia94       | K/94/6    |
| 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | Kenia94       | K/94/7    |
| 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | Kenia94       | K/94/8    |
| 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | Kenia94       | K/94/9    |
| 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | Kenia94       | K/94/10   |
| 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | Kenia94       | K/94/11   |
| 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | Kenia94       | K/94/12   |
| 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 0    | 0    | Kenia94       | K/94/13   |
| 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | Kenia94       | K/94/14   |
| 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | Kenia94       | K/94/15   |
| 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | Kenia94       | K/94/16   |
| 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | Kenia94       | K/94/17   |
| 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 0    | 0    | Kenia94       | K/94/18   |
| 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | Kenia94       | K/94/19   |
| 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | Kenia94       | K/94/20   |
| 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | Kenia94       | K/94/21   |
| 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | .    | .    | .    | .    | .    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | Kenia94       | K/94/22   |
| 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | Kenia94       | K/94/23   |
| 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | Kenia94       | K/94/24   |
| 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | Kenia94       | K/94/25   |
| 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | Kenia94       | K/94/26   |
| 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | Kenia94       | K/94/27   |
| 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | Kenia94       | K/94/28   |
| 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | Kenia/K96     | K/K/96/1  |
| 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | Kenia/K96     | K/K/96/2  |
| 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | Kenia/K96     | K/K/96/3  |
| 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | Kenia/K96     | K/K/96/4  |
| 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | Kenia/K96     | K/K/96/5  |
| 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | Kenia/K96     | K/K/96/6  |
| 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | Kenia/K96     | K/K/96/7  |
| 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | Kenia/K96     | K/K/96/8  |
| 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | Kenia/K96     | K/K/96/9  |
| 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | Kenia/K96     | K/K/96/10 |
| 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | Kenia/K96     | K/K/96/11 |
| 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | Kenia/K96iv   | K/K/96/iv |

Tab. 7-4: RAPD-PCR-Bandenauswertung – Teil 2 – Primer 1/1 bis 12/5.

| Genotyp    | Herkunft     | 1/1 | 1/2 | 1/3 | 1/4 | 2/1 | 2/2 | 2/3 | 2/4 | 6/1 | 6/2 | 6/3 | 6/4 | 6/5 | 12/1 | 12/2 | 12/3 | 12/4 | 12/5 |
|------------|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|
| K/G/96/1   | Kenia/G96    | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/G/96/2   | Kenia/G96    | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| K/G/96/3   | Kenia/G96    | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 1    | 0    | 0    | 1    |
| K/G/96/4   | Kenia/G96    | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 1    | 0    | 0    | 1    |
| K/G/96/5   | Kenia/G96    | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 1    | 0    | 0    | 1    |
| K/G/96/6   | Kenia/G96    | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 1    | 0    | 0    | 1    |
| M/93/1     | Mali93       | 1   | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/93/2     | Mali93       | 1   | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/93/3     | Mali93       | 1   | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/93/4     | Mali93       | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/93/5     | Mali93       | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/93/6     | Mali93       | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/93/7     | Mali93       | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/93/8     | Mali93       | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/93/9     | Mali93       | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/95/1     | Mali95       | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/95/2     | Mali95       | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| M/95/3     | Mali95       | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| M/95/4     | Mali95       | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| M/95/5     | Mali95       | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/95/6     | Mali95       | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| M/95/7     | Mali95       | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/95/8     | Mali95       | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/95/9     | Mali95       | 1   | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/95/10    | Mali95       | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/95/11    | Mali95       | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/95/12    | Mali95       | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/95/13    | Mali95       | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/95/14    | Mali95       | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/95/15    | Mali95       | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/95/16    | Mali95       | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/95/17    | Mali95       | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/95/18    | Mali95       | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/95/19    | Mali95       | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/95/iv/1  | Mali95iv     | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/95/iv/2  | Mali95iv     | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/95/iv/3  | Mali95iv     | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/ZM/95/1  | Mali/ZMill95 | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/ZM/95/2  | Mali/ZMill95 | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/ZM/95/3  | Mali/ZMill95 | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/ZM/95/4  | Mali/ZMill95 | 1   | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/ZM/95/5  | Mali/ZMill95 | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/ZM/95/6  | Mali/ZMill95 | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/ZM/95/7  | Mali/ZMill95 | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/ZM/95/8  | Mali/ZMill95 | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/ZS/95/1  | Mali/ZSo95   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/ZS/95/2  | Mali/ZSo95   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/ZS/95/3  | Mali/ZSo95   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| M/ZS/95/4  | Mali/ZSo95   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| M/ZS/95/5  | Mali/ZSo95   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/ZS/95/6  | Mali/ZSo95   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| M/ZS/95/7  | Mali/ZSo95   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/ZS/95/8  | Mali/ZSo95   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/ZS/95/9  | Mali/ZSo95   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/ZS/95/10 | Mali/ZSo95   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/ZS/95/11 | Mali/ZSo95   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/ZS/95/12 | Mali/ZSo95   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/ZS/95/13 | Mali/ZSo95   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/ZS/95/14 | Mali/ZSo95   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |

Tab. 7-5: RAPD-PCR-Bandenauswertung – Teil 2 – Primer 12/6 bis 15/5.

| 12/6 | 12/7 | 12/8 | 13/1 | 13/2 | 13/3 | 13/4 | 13/5 | 14/1 | 14/2 | 14/3 | 14/4 | 14/5 | 15/1 | 15/2 | 15/3 | 15/4 | 15/5 | Herkunft     | Genotyp    |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------------|------------|
| 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | Kenia/G96    | K/G/96/1   |
| 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | Kenia/G96    | K/G/96/2   |
| 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | Kenia/G96    | K/G/96/3   |
| 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 0    | 0    | Kenia/G96    | K/G/96/4   |
| 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | Kenia/G96    | K/G/96/5   |
| 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 0    | 0    | Kenia/G96    | K/G/96/6   |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | Mali93       | M/93/1     |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | Mali93       | M/93/2     |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | Mali93       | M/93/3     |
| 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Mali93       | M/93/4     |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Mali93       | M/93/5     |
| 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Mali93       | M/93/6     |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Mali93       | M/93/7     |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Mali93       | M/93/8     |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Mali93       | M/93/9     |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Mali95       | M/95/1     |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Mali95       | M/95/2     |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Mali95       | M/95/3     |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Mali95       | M/95/4     |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Mali95       | M/95/5     |
| 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Mali95       | M/95/6     |
| 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Mali95       | M/95/7     |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Mali95       | M/95/8     |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | Mali95       | M/95/9     |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Mali95       | M/95/10    |
| 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Mali95       | M/95/11    |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Mali95       | M/95/12    |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Mali95       | M/95/13    |
| 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Mali95       | M/95/14    |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Mali95       | M/95/15    |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Mali95       | M/95/16    |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Mali95       | M/95/17    |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Mali95       | M/95/18    |
| 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Mali95       | M/95/19    |
| 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Mali95iv     | M/95/iv/1  |
| 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Mali95iv     | M/95/iv/2  |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Mali95iv     | M/95/iv/3  |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Mali/ZMill95 | M/ZM/95/1  |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | Mali/ZMill95 | M/ZM/95/2  |
| 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Mali/ZMill95 | M/ZM/95/3  |
| 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | Mali/ZMill95 | M/ZM/95/4  |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Mali/ZMill95 | M/ZM/95/5  |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Mali/ZMill95 | M/ZM/95/6  |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Mali/ZMill95 | M/ZM/95/7  |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Mali/ZMill95 | M/ZM/95/8  |
| 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Mali/ZSo95   | M/ZS/95/1  |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Mali/ZSo95   | M/ZS/95/2  |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Mali/ZSo95   | M/ZS/95/3  |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Mali/ZSo95   | M/ZS/95/4  |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Mali/ZSo95   | M/ZS/95/5  |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Mali/ZSo95   | M/ZS/95/6  |
| 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Mali/ZSo95   | M/ZS/95/7  |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Mali/ZSo95   | M/ZS/95/8  |
| 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Mali/ZSo95   | M/ZS/95/9  |
| 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Mali/ZSo95   | M/ZS/95/10 |
| 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Mali/ZSo95   | M/ZS/95/11 |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Mali/ZSo95   | M/ZS/95/12 |
| 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Mali/ZSo95   | M/ZS/95/13 |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Mali/ZSo95   | M/ZS/95/14 |

Tab. 7-6: RAPD-PCR-Bandenauswertung – Teil 3 – Primer 1/1 bis 12/5.

| Genotyp    | Herkunft    | 1/1 | 1/2 | 1/3 | 1/4 | 2/1 | 2/2 | 2/3 | 2/4 | 6/1 | 6/2 | 6/3 | 6/4 | 6/5 | 12/1 | 12/2 | 12/3 | 12/4 | 12/5 |
|------------|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|
| M/ZS/95/15 | Mali/ZSo95  | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/ZS/95/16 | Mali/ZSo95  | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/ZS/95/17 | Mali/ZSo95  | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/ZS/95/18 | Mali/ZSo95  | 1   | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/ZS/95/19 | Mali/ZSo95  | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/ZS/95/20 | Mali/ZSo95  | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| M/ZS/95/21 | Mali/ZSo95  | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    |
| N/94/1     | Niger94     | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| N/94/2     | Niger94     | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| N/94/3     | Niger94     | 1   | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| N/94/4     | Niger94     | 1   | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| N/94/5     | Niger94     | 1   | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| S/88/1     | Sudan88/89  | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| S/88/2     | Sudan88/89  | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| S/88/3     | Sudan88/89  | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| S/88/4     | Sudan88/89  | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| S/93/1     | Sudan93     | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| S/93/2     | Sudan93     | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| S/93/3     | Sudan93     | 0   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| S/93/4     | Sudan93     | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| S/93/5     | Sudan93     | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| S/93/6     | Sudan93     | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| S/93/7     | Sudan93     | 0   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| S/93/8     | Sudan93     | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| S/93/9     | Sudan93     | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| S/93/10    | Sudan93     | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| Ta/94/1    | Tansania94  | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| Ta/94/2    | Tansania94  | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| Ta/94/3    | Tansania94  | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| Ta/94/4    | Tansania94  | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| Ta/94/5    | Tansania94  | 0   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| Ta/94/6    | Tansania94  | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| Ta/94/7    | Tansania94  | 0   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    |
| Ta/94/8    | Tansania94  | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| Ta/94/9    | Tansania94  | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| Ta/94/10   | Tansania94  | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| To/K/88/1  | Togo/Kava88 | 1   | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| To/K/88/2  | Togo/Kava88 | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| To/K/88/3  | Togo/Kava88 | 1   | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| To/S/88/1  | Togo/Sav88  | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| To/S/88/2  | Togo/Sav88  | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| To/S/88/3  | Togo/Sav88  | 1   | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| To/S/88/4  | Togo/Sav88  | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| To/S/88/5  | Togo/Sav88  | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| Y/88/1     | Jemen88     | 0   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| Y/88/2     | Jemen88     | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| Y/88/3     | Jemen88     | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    |
| Y/88/4     | Jemen88     | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    |
| Y/88/5     | Jemen88     | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |
| Y/88/6     | Jemen88     | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 1   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    |

Tab. 7-7: RAPD-PCR-Bandenauswertung – Teil 3 – Primer 12/6 bis 15/5.

| 12/6 | 12/7 | 12/8 | 13/1 | 13/2 | 13/3 | 13/4 | 13/5 | 14/1 | 14/2 | 14/3 | 14/4 | 14/5 | 15/1 | 15/2 | 15/3 | 15/4 | 15/5 | Herkunft    | Genotyp    |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------------|------------|
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Mali/ZSo95  | M/ZS/95/15 |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Mali/ZSo95  | M/ZS/95/16 |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Mali/ZSo95  | M/ZS/95/17 |
| 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Mali/ZSo95  | M/ZS/95/18 |
| 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Mali/ZSo95  | M/ZS/95/19 |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Mali/ZSo95  | M/ZS/95/20 |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Mali/ZSo95  | M/ZS/95/21 |
| 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Niger94     | N/94/1     |
| 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Niger94     | N/94/2     |
| 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Niger94     | N/94/3     |
| 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Niger94     | N/94/4     |
| 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Niger94     | N/94/5     |
| 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | Sudan88/89  | S/88/1     |
| 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | Sudan88/89  | S/88/2     |
| 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | Sudan88/89  | S/88/3     |
| 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 0    | 0    | Sudan88/89  | S/88/4     |
| 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | Sudan93     | S/93/1     |
| 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | Sudan93     | S/93/2     |
| 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | Sudan93     | S/93/3     |
| 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | Sudan93     | S/93/4     |
| 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | Sudan93     | S/93/5     |
| 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | Sudan93     | S/93/6     |
| 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | Sudan93     | S/93/7     |
| 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | Sudan93     | S/93/8     |
| 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | Sudan93     | S/93/9     |
| 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | Sudan93     | S/93/10    |
| 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | Tansania94  | Ta/94/1    |
| 0    | 0    | 1    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | Tansania94  | Ta/94/2    |
| 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | Tansania94  | Ta/94/3    |
| 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | Tansania94  | Ta/94/4    |
| 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | Tansania94  | Ta/94/5    |
| 0    | 0    | 1    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | Tansania94  | Ta/94/6    |
| 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | Tansania94  | Ta/94/7    |
| 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | Tansania94  | Ta/94/8    |
| 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | Tansania94  | Ta/94/9    |
| 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | Tansania94  | Ta/94/10   |
| 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Togo/Kava88 | To/K/88/1  |
| 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Togo/Kava88 | To/K/88/2  |
| 1    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Togo/Kava88 | To/K/88/3  |
| 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Togo/Sav88  | To/S/88/1  |
| 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Togo/Sav88  | To/S/88/2  |
| 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | Togo/Sav88  | To/S/88/3  |
| 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Togo/Sav88  | To/S/88/4  |
| 1    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | Togo/Sav88  | To/S/88/5  |
| 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | Jemen88     | Y/88/1     |
| 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | Jemen88     | Y/88/2     |
| 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | Jemen88     | Y/88/3     |
| 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | Jemen88     | Y/88/4     |
| 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | Jemen88     | Y/88/5     |
| 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | Jemen88     | Y/88/6     |





## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Abbasher, A. A. (1994) Microorganisms associated with *Striga hermonthica* and possibilities of their utilization as biological control agents. PLITS 12/1, Verlag W. & S. Koch, Stuttgart.
- Abbasher, A. A., Hess, D. E., Sauerborn, J. und Kroschel, J. (1996) Effect of different *Fusarium* spp. on seed germination of *Striga hermonthica* (sorghum and millet strains), *S. asiatica*, and *S. gesneroides*. In: M. T. Moreno, Cubero, J. I., Berner, D., Joel, D., Musselman, L. J. und Parker, C. (Hrsg.), Sixth International Parasitic Weed Symposium. Cordoba, Spanien, Advances in Parasitic Plant Research, S. 879-887.
- Aflakpui, G. K. S., Gregory, P. J. und Froud-Williams, R. J. (1996) Germination of *Striga hermonthica* seed at constant temperatures. In: M. T. Moreno, Cubero, J. I., Berner, D., Joel, D., Musselman, L. J. und Parker, C. (Hrsg.), Sixth International Parasitic Weed Symposium. Cordoba, Spanien, Advances in Parasitic Plant Research, S. 433-440.
- Albersheim, P., Neukom, H. und Deuel, H. (1960) Über die Bildung von ungesättigten Abbauprodukten durch ein pektinabbauendes Enzym. Helv Chim Acta **43**: 1422-1426.
- Ayers, W. A., Papavizas, G. C. und Diem, A. F. (1966) Polygalacturonate trans-eliminase and polygalacturonase production by *Rhizoctonia solani*. Phytopathology **56**: 1006-1011.
- Ba, A. T. (1978) Etude d'une phanérogame parasite africaine *Striga gesneroides*. Phytomorphology **27**: 359-368.
- Babaleye, T. (1989) *Striga* - The curse of African agriculture. Int Pest Control, S. 67-68.
- Babiker, A. G. T., Ejeta, G., Butler, L. G. und Woodson, W. R. (1993) Ethylene biosynthesis and strigol-induced germination of *Striga asiatica*. Physiol Plant **88**: 359-365.
- Babiker, A. G. T., Parker, C. und Suttle, J. C. (1992) Induction of *Striga* seed germination by thidiazuron. Weed Res **32**: 243-248.
- Bäcker, M. (1997) Exoenzyme der Keimschläuche parasitischer Samenpflanzen der Familie *Scrophulariaceae*. Diplomarbeit, Inst. f. Pflanzenbiochemie, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.

- Bailey, J. A. (1982) Mechanisms of phytoalexin accumulation. In: J. A. Bailey und Mansfield, J. W. (Hrsg.), *Phytoalexins*. Blackie & Sons Ltd., Glasgow und London, UK, S. 289-318.
- Bary, A. de (1879) *Die Erscheinung der Symbiose*. Verlag Karl J. Trübner, Straßburg.
- Bashir, M. O. und Musselman, L. J. (1984) Some natural enemies of *Striga hermonthica* in the Sudan. *Trop Pest Manage* **30**: 211-212.
- Baumann, I. (1996) Exoenzyme der Keimschläuche der parasitischen Samenpflanzen *Striga hermonthica* (Del.) Benth. und *Orobanche ramosa* (L.) (*Scrophulariaceae*). Diplomarbeit, Institut für Pflanzenbiochemie, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.
- Baxevanis, A. und Ouellette, B. F. F. (Hrsg.) (1998) *Bioinformatics: a practical guide to the analysis of genes and proteins*. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA.
- Bebawi, F. F. (1981) Intraspecific physiological variants of *Striga hermonthica*. *Esp Agric* **7**: 419 pp.
- Bergmann, C. (1992) Allelopathische Induktion der Keimung von *Orobanche crenata* Forsk. Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.
- Bernard, N. (1909) L'évolution dans la symbiose, les orchidées et leurs champignons commenseaux. *Ann Sci Nat Bot* **9**: 1-196.
- Berner, D. K., Cardwell, K. F., Faturoti, B. O., Ikie, F. O. und Williams, O. A. (1994) Relative roles of wind, crop seeds, and cattle in dispersal of *Striga* spp. *Plant Dis* **78**: 402-407.
- Berner, D. K., Schaad, N. W. und Volksch, B. (1999) Use of ethylene-producing bacteria for stimulation of *Striga* spp. seed germination. *Biol Control* **15**: 274-282.
- Bharathalakshmi, S. S. B., Werth, C. R. und Musselman, L. J. (1990) A study of genetic diversity among host-specific populations of the witchweed *Striga hermonthica* (*Scrophulariaceae*) in Africa. *Plant Syst Evol* **172**: 1-12.
- Biely, P., Mislovicova, D. und Toman, R. (1985) Soluble chromogenic substrates for the assay of endo-1,4- $\beta$ -xylanases and endo-1,4- $\beta$ -glucanases. *Anal Biochem* **144**: 142-146.
- Bischof, F. und Koch, W. (1973) Einige Beiträge zur Biologie von *Orobanche aegyptiaca* L. Symposium on Parasitic Weeds, European Weed Research Council. Malta, S. 48-54.

- Boone, L. S., Fate, G., Chang, M. und Lynn, D. G. (1995) Seed germination. In: M. C. Press und Graves, J. D. (Hrsg.), *Parasitic Plants*. Chapman & Hall Ltd., London, UK.
- Borisjuk, N., Borisjuk, L., Petjuch, G. und Hemleben, V. (1994) Comparison of nuclear ribosomal RNA genes among *Solanum* species and other *Solanaceae*. *Genome* **37**: 271-279.
- Bouillant, M. L., Kabir, M., Alexandre, G., Jacoud, C., Miche, L., Bally, R., Salle, G. und Ouedraogo, O. (1996) Inhibition of *Striga* seed germination by bacteria isolated from soil under sorghum field. In: M. T. Moreno, Cubero, J. I., Berner, D., Joel, D., Musselman, L. J. und Parker, C. (Hrsg.), *Sixth International Parasitic Weed Symposium*. Cordoba, Spanien, *Advances in Parasitic Plant Research*, S. 899-905.
- Brooks, M. E. (1995) Untersuchungen zur Exoenzymausschüttung der Keimschläuche der parasitischen Blütenpflanzen *Orobanche crenata* Forsk. und *Striga hermonthica* (L.) Kuntze (*Scrophulariaceae*). Diplomarbeit, Inst. f. Pflanzenbiochemie, vorm. Inst. f. chemische Pflanzenphysiologie, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.
- Brown, R. und Edwards, M. (1945) Effects of thiourea and allylthiourea on the germination of the seeds of *Striga lutea*. *Nature* **155**: 455-456.
- Brown, R., Johnson, A. W., Robinson, E. und Todd, A. R. (1949) The stimulant involved in the germination of *Striga hermonthica*. *Proc R Soc Bot* **136**: 1 pp.
- Butler, L. G. (1995) Chemical communication between the parasitic weed *Striga* and its crop host. A new dimension of allelochemistry. *ACS Symposium Series No. 582*: 158-168.
- Chancellor, R. J., Parker, C. und Teferedegn, T. (1971) Stimulation of dormant weed seed germination by 2-chloroethylphosphonic acid. *Pestic Sci* **2**: 35-37.
- Chang, M. und Lynn, D. G. (1986) The haustorium and the chemistry of host recognition in parasitic angiosperms. *J Chem Ecol* **12**: 561-579.
- Chang, M., Netzly, D. H., Butler, L. G. und Lynn, D. G. (1986) Chemical regulation of distance: characterization of the first natural host germination stimulant for *Striga asiatica*. *J Am Chem Soc* **108**: 7858-7860.
- Cherif Ari, O., Housley, T. L. und Ejeta, G. (1990) Sorghum root length density and the potential for avoiding *Striga* parasitism. *Plant Soil* **121**: 67-72.

- Ciotola, M., Hallett, S. G. und Watson, A. K. (1996) Impact of *Fusarium oxysporum* isolate M12-4A upon seed germination of *Striga hermonthica in vitro*. In: M. T. Moreno, Cubero, J. I., Berner, D., Joel, D., Musselman, L. J. und Parker, C. (Hrsg.), Sixth International Parasitic Weed Symposium. Cordoba, Spanien, Advances in Parasitic Plant Research, S. 871-878.
- Coggon, P., Luhan, P. A. und McPhail, A. T. (1973) Crystal and molecular structure of the germination stimulant strigol by X-ray analysis. J Chem Soc Perkin Trans II: 465-469.
- Cook, C. E., Whichard, L. P., Turner, B., Wall, M. E. und Egley, G. H. (1966) Germination of witchweed (*Striga lutea* Lour.): isolation and properties of a potent stimulant. Science **154**: 1189-1190.
- Dawoud, D. A., Sauerborn, J. und Kroschel, J. (1996) Transplanting of sorghum: a method to reduce yield losses caused by the parasitic weed *Striga*. In: M. T. Moreno, Cubero, J. I., Berner, D., Joel, D., Musselman, L. J. und Parker, C. (Hrsg.), Sixth International Parasitic Weed Symposium. Cordoba, Spanien, Advances in Parasitic Plant Research, S. 777-785.
- Deshpande, V. und Eriksson, K.-E. (1988) 1,4- $\beta$ -glucosidases of *Sporotrichum pulverulentum*. In: W. A. Wood und Kellog, S. T. (Hrsg.), Methods in Enzymology. Academic Press, New York, NY, USA, Vol. 160, S. 415-424.
- Deverall, B. J. (1982) Introduction. In: J. A. Bailey und Mansfield, J. W. (Hrsg.), Phytoalexins. Blackie & Sons Ltd., Glasgow und London, UK, S. 1-20.
- Dixon, N. H. und Parker, C. (1984) Aspects of the resistance of sorghum varieties to *Striga* species. Third International Symposium on Parasitic Weeds. Aleppo, Syrien, S. 123-132.
- Dörr, I. (1997) How *Striga* parasitizes its host: A TEM and SEM study. Ann Bot **79**: 463-472.
- Doggett, H. (1965) *Striga hermonthica* on sorghum in East Africa. J Agric Sci **65**: 183-194.
- Doggett, H. (1984) *Striga* - its biology and control - an overview. Workshop on the Biology and Control of *Striga*. Dakar, Senegal, S. 27-36.
- Doggett, H. (1988) Sorghum. 2. Ausg., John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA.
- Drennan, D. S. H. und El Hiweris, S. O. (1979) Changes in growth regulating substances in *Sorghum vulgare* infected by *Striga hermonthica*. In: L. J. Musselman, Worsham, A. D. und Eplee, R. E. (Hrsg.), Proceedings of the Second International Symposium on Parasitic Weeds. North Carolina State University, Raleigh, NC, USA, S. 144-155.

- Edwards, W. G., Hiron, R. P. und Mallet, A. I. (1976) Aspects of germination of *Orobancha crenata* seed. Z Pflanzenphysiol **80**: 105-111.
- Egley, G. H. (1972) Influence of the seed envelope and growth regulators upon seed dormancy in witchweed (*Striga lutea* Lour.). Ann Bot **36**: 755-770.
- Egley, G. H. und Dale, J. E. (1970) Ethylene, 2-chloroethylphosphonic acid, and witchweed germination. Weed Sci **18**: 586-589.
- Egley, G. H., Eplee, R. E. und Norris, R. S. (1990) Discovery and testing of ethylene as a witchweed seed germination stimulant. In: P. F. Sand, Eplee, R. E. und Westbrooks, R. G. (Hrsg.), Witchweed Research and Control in the United States of America. Weed Science Society of America, Champaign, IL, USA, S. 56-67.
- Ejeta, G., Butler, L. G. und Babiker, A. G. T. (1993) New approaches to the control of *Striga*: *Striga* research at Purdue University, Agricultural Experiment Station, Purdue University, West Lafayette, IN, USA.
- Ejeta, G., Butler, L. G., Hess, D. E. und Vogler, R. K. (1991) Genetic and breeding strategies for *Striga* resistance in sorghum. Fifth International Symposium on Parasitic Weeds. Nairobi, Kenia, S. 539-544.
- Eplee, R. E. (1975) Ethylene: a witchweed seed germination stimulant. Weed Sci **23**: 433-436.
- Eplee, R. E. und Langston, M. A. (1971) Contact soil fumigation. Proceedings of the Southern Weed Science Society. Little Rock, AR, USA, S. 127.
- Eplee, R. E. und Norris, R. S. (1987) Field research techniques. In: L. J. Musselman (Hrsg.), Parasitic Weeds in Agriculture. Volume 1. *Striga*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, S. 271-280.
- Eplee, R. E. und Norris, R. S. (1995) Control of parasitic weeds. In: M. C. Press und Graves, J. D. (Hrsg.), Parasitic Plants. Chapman & Hall Ltd., London, UK, S. 256-277.
- Eplee, R. E., Norris, R. S. und Harris, E. C. (1984) Soil solarization for witchweed seed devitalization. Annual Report, Whiteville Methods Dev. Ctr. USDA, APHIS, Plant Protection and Quarantine, Whiteville, NC, USA, S. 59-63.
- Fischer, E. (1997) Methodische Untersuchungen zur *In vitro*-Kultur von *Striga hermonthica*. Diplomarbeit, Inst. f. Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung und Populationsgenetik, Universität Hohenheim, Stuttgart-Hohenheim.

- French, R. C. und Sherman, L. J. (1976) Factors affecting dormancy, germination, and seedling development of *Aeginetia indica* L. (*Orobanchaceae*). *Am J Bot* **63**: 558-570.
- Frey, H.-P. und Zieloff, K. (1993) Qualitative und quantitative Dünnschichtchromatographie: Grundlagen und Praxis. VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge.
- Frick, E. (1996) Biochemische Synthese und Identifikation des Haustorialinduktors 2,6-Dimethoxyparabenzochinon. Diplomarbeit, Inst. f. Pflanzenbiochemie, vorm. Inst. f. chemische Pflanzenphysiologie, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.
- Frick, E., Frahne, D. und Wegmann, K. (1996) Biochemical synthesis of 2,6-dimethoxy-parbenzoquinone - a haustorial stimulant of *Striga asiatica* (L.) Kuntze. *Nat Prod Lett* **9**: 153-159.
- Frost, D. L., Gurney, A. L., Press, M. C. und Scholes, J. D. (1997) *Striga hermonthica* reduces photosynthesis in sorghum: the importance of stomatal limitations and a potential role for ABA? *Plant Cell Environ* **20**: 483-492.
- Gbehounou, G., Pieterse, A. H. und Verkleij, J. A. C. (1996) A study on primary dormancy of *Striga hermonthica* seeds in the northern provinces of the Republic of Benin. In: M. T. Moreno, Cubero, J. I., Berner, D., Joel, D., Musselman, L. J. und Parker, C. (Hrsg.), Sixth International Parasitic Weed Symposium. Cordoba, Spanien, Advances in Parasitic Plant Research, S. 451-457.
- Gebhardt, C., Ritter, E., Debener, T., Schachtschabel, U., Walkemeier, B., Uhrig, H. und Salamini, F. (1989) RFLP analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum*. *Theor Appl Genet* **78**: 65-75.
- Graves, J. D., Press, M. C. und Stewart, G. R. (1989) A carbon balance model of the sorghum-*Striga hermonthica* host-parasite association. *Plant Cell Environ* **12**: 101-107.
- Gruber, V. (1991) Heterozygosity in tetraploid potatoes revealed by rDNA polymorphism analysis of their dihaploid progenies a contribution to chromosome assignment. *Plant Mol Biol* **17**: 1045-1054.
- Gurney, A. L., Press, M. C. und Ransom, J. K. (1995) The parasitic angiosperm *Striga hermonthica* can reduce photosynthesis of its sorghum and maize hosts in the field. *J Exp Bot* **46**: 1817-1823.

- Hauck, C., Müller, S. und Schildknecht, H. (1992) A germination stimulant for parasitic flowering plants from *Sorghum bicolor* a genuine host plant. J Plant Physiol **139**: 474-478.
- Hauck, C. und Schildknecht, H. (1990) Separation of enantiomers of the germination stimulant strigol on cellulose triacetate and determination of their biological activity. J Plant Physiol **136**: 126-128.
- Heather, J. B., Mittal, R. S. D. und Sih, C. J. (1974) The total synthesis of d1-strigol. J Am Chem Soc **96**: 1976-1977.
- Helentjaris, T., King, G., Slocum, M., Sidenstrang, C. und Wegman, S. (1985) Restriction fragment length polymorphisms as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding. Plant Mol Biol **5**: 109-118.
- Heller, R. und Wegmann, K. (2000) Mechanisms of resistance to *Striga hermonthica* (Del.) Benth. in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. In: B. I. G. Haussmann, Hess, D. E., Koyama, M. L., Grivet, L., Rattunde, H. F. W. und Geiger, H. H. (Hrsg.), Breeding for Striga Resistance in Cereals. Proceedings of a Workshop. IITA, Ibadan, Nigeria, Markgraf Verlag, Weikersheim, S. 19-28.
- Hemleben, V. (1990) Molekularbiologie der Pflanzen. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Hemleben, V., Zentgraf, U., King, K., Borisjuk, N. und Schweizer, G. (1992) Middle repetitive and highly repetitive sequences detect polymorphisms in plants. Adv Mol Genet **5**: 157-170.
- Hemsley, J. H. (1906) XCII. *Scrophulariaceae*. In: W. T. Thiselton-Dyer (Hrsg.), Flora of tropical Africa. L. Reeve Co., London, UK, Vol. 4,2 - *Hydrophyllaceae* to *Pedalineae*, S. 399-415.
- Hepper, F. N. (1984) The species of *Striga* in East Africa. Third International Symposium on Parasitic Weeds. Aleppo, Syrien, S. 262-265.
- Hess, D. E., Ejeta, G. und Butler, L. G. (1992) Selecting sorghum genotypes expressing a quantitative biosynthetic trait that confers resistance to *Striga*. Phytochem **31**: 493-498.
- Hezewijk, M. J. van, Beem, A. P. van, Verkleij, J. A. C. und Pieterse, A. H. (1993) Germination of *Orobancha crenata* seeds, as influenced by conditioning temperature and period. Can J Bot **71**: 786-792.

- Hillis, D. M. und Bull, J. J. (1993) An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst Biol* **42**: 182-192.
- Hipskind, J. D., Hanau, R., Leite, B. und Nicholson, R. L. (1990) Phytoalexin accumulation in sorghum identification of an apigeninidin acyl ester. *Physiol Mol Plant Pathol* **36**: 381-396.
- Hoagland, D. R. und Arnon, D. I. (1950) Circular 347. California Agr Exp Stat., Berkeley, CA, USA.
- Homans, A. L. und Fuchs, A. (1970) Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *J Chromatogr* **51**: 327-329.
- Hood, M. E., Condon, J. M., Timko, M. P. und Riopel, J. L. (1998) Primary haustorial development of *Striga asiatica* on host and nonhost species. *Phytopathology* **88**: 70-75.
- Hsiao, A. I., Worsham, A. D. und Moreland, D. E. (1979) Factors affecting conditioning and germination of witchweed (*Striga asiatica*) seeds under laboratory conditions. In: L. J. Musselman, Worsham, A. D. und Eplee, R. E. (Hrsg.), Proceedings of the Second International Symposium on Parasitic Weeds. North Carolina State University, Raleigh, NC, USA, S. 193-201.
- Hsiao, A. I., Worsham, A. D. und Moreland, D. E. (1981) Effects of sodium hypochlorite and certain plant growth regulators on germination of witchweed (*Striga asiatica*) seeds. *Weed Sci* **29**: 98-100.
- Hsiao, A. I., Worsham, A. D. und Moreland, D. E. (1988) Effects of chemicals often regarded as germination stimulants on seed conditioning and germination of witchweed (*Striga asiatica*). *Ann Bot* **62**: 17-24.
- Innis, M. A., Gelfond, D. H., Sninsky, J. J. und White, T. J. (1990) PCR protocols. In: M. A. Innis *et al.* (Hrsg.), A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Jackson, M. B. und Parker, C. (1991) Induction of germination by a strigol analogue requires ethylene action in *Striga hermonthica* but not in *S. forbesii*. *J Plant Physiol* **138**: 383-386.



- Joel, D. M. und Losner-Goshen, D. (1994) Early host-parasite interaction: models and observations of host root penetration by the haustorium of *Orobanch*e. Proceedings of the Third International Workshop on *Orobanch*e and Related *Striga* Research. Royal Tropical Institute, Amsterdam, NL, S. 237-247.
- Johnson, A. W., Gowda, G., Hassanali, A., Knox, J., Monaco, S., Razavi, Z. und Rosebery, G. (1981) The preparation of synthetic analogues of strigol. J Chem Soc Perkin Trans I: 1734-1743.
- Johnson, A. W., Rosebery, G. und Parker, C. (1976) A novel approach to *Striga* and *Orobanch*e control using synthetic germination stimulants. Weed Res **16**: 223-227.
- Jost, A., Kroschel, J. und Sauerborn, J. (1996) Studies on *Smicronyx* spp. and *Junonia orithya* and their potential for biological control of *Striga hermonthica* in Northern Ghana. In: M. T. Moreno, Cubero, J. I., Berner, D., Joel, D., Musselman, L. J. und Parker, C. (Hrsg.), Sixth International Parasitic Weed Symposium. Cordoba, Spanien, Advances in Parasitic Plant Research, S. 889-898.
- Katzir, N., Portnoy, V., Tzuri, G., Castejón-Muñoz, M. und Joel, D. M. (1996) Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in the study of the parasitic weed *Orobanch*e. Theor Appl Genet **93**: 367-372.
- Kim, S. K., Akintunde, A. Y. und Walker, P. (1994) Responses of maize, sorghum, and millet host plants to infestation by *Striga hermonthica*. Crop Prot **13**: 582-590.
- Krebs, K. G., Heusser, D. und Wimmer, H. (1967) Z. Sprühreagentien. In: E. Stahl (Hrsg.), Dünnschicht-Chromatographie: Ein Laboratoriumshandbuch. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 813-859.
- Kreike, C. M., Koning, J. R. A. de und Krens, F. A. (1990) Non-radioactive detection of single-copy DNA-DNA hybrids. Plant Mol Biol Rep **8**: 172-179.
- Kuč, J. (1995) Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants (review). Ann Rev Phytopathol **33**: 275-297.
- Kuhn, R. und Jerchel, D. (1941) Über Invertseifen, VIII. Mitteil.: Reduktion von Tetrazoliumsalzen durch Bakterien, gärende Hefe und keimende Samen. Ber Dtsch Chem Ges B **6**: 949-952.

- Kuiper, E., Koevoets, P. L. M., Verkleij, J. A. C. und Pieterse, A. H. (1996a) Genetic variability of *Striga aspera* and *Striga hermonthica*. Are they really two distinct species? In: M. T. Moreno, Cubero, J. I., Berner, D., Joel, D., Musselman, L. J. und Parker, C. (Hrsg.), Sixth International Parasitic Weed Symposium. Cordoba, Spanien, Advances in Parasitic Plant Research, S. 123-134.
- Kuiper, E., Verkleij, J. A. C. und Pieterse, A. H. (1996b) Differences in the primary dormancy pattern of *Striga* species; an ongoing study. In: M. T. Moreno, Cubero, J. I., Berner, D., Joel, D., Musselman, L. J. und Parker, C. (Hrsg.), Sixth International Parasitic Weed Symposium. Cordoba, Spanien, Advances in Parasitic Plant Research, S. 441-450.
- Kumar, L. S. S. (1940) *Striga* research in Bombay. Ind Farm **1**: 609-610.
- Kust, C. A. (1963) Dormancy and viability of witchweed seeds as affected by temperature and relative humidity during storage. Weed Sci **11**: 247-250.
- Lagoke, S. T., Parkinson, V. und Agunbiade, R. M. (1991) Parasitic weeds and control methods in Africa. In: S. K. Kim (Hrsg.), International Workshops organized by IITA, ICRISAT and IDRC. IITA, Ibadan, Nigeria, Combating *Striga* in Africa, S. 3-15.
- Lewin, C. H. (1932) Witchweed (*Striga lutea* Lour. var. *bicolor* O. Kuntze). N Rhod Dep Agric Bull **2**: 51 pp.
- Linke, K. H., Saxena, M. C., Sauerborn, J. und Masri, H. (1988) Effect of soil solarization on the yield of food legumes and on pest control. Proceedings of the First International Conference on Soil Solarization. Amman, Jordanien, FAO Plant Production and Plant Protection, Rom, Italien, S. 139-154.
- Logan, D. C. und Stewart, G. R. (1991) Role of ethylene in the germination of the hemiparasite *Striga hermonthica*. Plant Physiol **97**: 1435-1438.
- Logan, D. C. und Stewart, G. R. (1995) Thidiazuron stimulates germination and ethylene production in *Striga hermonthica* - comparison with the effects of GR-24, ethylene, and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. Seed Sci Res **5**: 99-108.
- MacAlpine, G. A., Raphael, R. A., Shaw, A., Taylor, A. W. und Wild, H.-J. (1974) Synthesis of the germination stimulant ( $\pm$ )-strigol. J Chem Soc Chem Comm: 834-835.
- MacIlwain, C. (1999) Access issues may determine whether agri-biotech will help the world's poor. Nature **402**: 341-345.

- Maiti, R. K., Ramaiah, K. V., Bisen, S. S. und Chidley, V. L. (1984) A comparative study of the haustorial development of *Striga asiatica* (L.) Kuntze on sorghum cultivars. *Ann Bot* **54**: 447-457.
- Mayer, A. M. und Bar Nun, M. (1994) Metabolism during conditioning and germination of *Orobanche aegyptiaca* seeds. In: A. H. Pieterse, Verkleij, J. A. C. und Borg, S. J. ter (Hrsg.), Proceedings of the Third International Workshop on *Orobanche* and Related *Striga* Research. Amsterdam, NL, S. 146-156.
- Mboob, S. S. (1986) A regional programme for West and Central Africa. Proceedings of the FAO/OAU All-African Government Consultation on *Striga* Control. Maroua, Cameroon.
- Miltenburg, R. van, Rüger, B., Grünewald-Janho, S., Leons, M. und Schröder, C. (Hrsg.) (1995) The DIG system user's guide for filter hybridization. Boehringer Mannheim, Mannheim.
- Mohamed, K. I. (1994) Biosystematics and diversification in the genus *Striga* Lour. (*Scrophulariaceae*) in Africa. Dissertation, Old Dominion University, Norfolk, VA, USA.
- Mohamed, K. I., Musselman, L. J., Aigbokhan, E. I. und Berner, D. K. (1996) Evolution and taxonomy of agronomically important *Striga* species. In: M. T. Moreno, Cubero, J. I., Berner, D., Joel, D., Musselman, L. J. und Parker, C. (Hrsg.), Sixth International Parasitic Weed Symposium. Cordoba, Spanien, Advances in Parasitic Plant Research, S. 53-73.
- Molau, U. (1995) Reproductive ecology and biology. In: M. C. Press und Graves, J. D. (Hrsg.), Parasitic Plants. Chapman & Hall Ltd., London, New York, S. 141-176.
- Müller, K. O. und Börger, H. (1940) Experimentelle Untersuchungen über die *Phytophthora*-Resistenz der Kartoffel. *Arb. Biol. Reichsanst. f. Land- u. Forstw. (Berlin)* **23**: 189-231.
- Müller, S., Hauck, C. und Schildknecht, H. (1992) Germination stimulants produced by *Vigna unguiculata* Walp cv Saunders Upright. *J Plant Growth Reg* **11**: 77-84.
- Mullis, K. B., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R. K., Horn, G. und Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **51**: 263-273.

- Murashige, T. und Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* **15**: 473-497.
- Musselman, L. J. (1980) The biology of *Striga*, *Orobanch*e, and other root-parasitic weeds. *Ann Rev Phytopathol* **18**: 463-489.
- Musselman, L. J. (1987) Taxonomy of witchweeds. In: L. J. Musselman (Hrsg.), *Parasitic Weeds in Agriculture. Volume 1. Striga*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, S. 3-12.
- Musselman, L. J., Bharathalakshmi, S. S. B., Knepper, D. A., Mohamed, K. I. und White, C. L. (1988) Recent research on the biology of *Striga asiatica*, *S. gesneroides*, and *S. hermonthica*. Proceedings of the International Workshop "Combating Striga in Africa". IITA, Ibadan, Nigeria, S. 31-41.
- Musselman, L. J. und Hepper, F. N. (1986) The witchweeds (*Striga*, *Scrophulariaceae*) of the Sudan Republic. *Kew Bull* **41**: 205-221.
- Musselman, L. J. und Hepper, F. N. (1988) Studies in the flora of Arabia XX: The genus *Striga* in Arabia. *Notes RBG Edinb.* **45(1)**: 43-50.
- Musselman, L. J. und Parker, C. (1982) Preliminary host ranges of some strains of economically important broomrapes (*Orobanch*e). *Parasites of major crops. Econ Bot* **36**: 270-273.
- Musselman, L. J. und Press, M. C. (1995) Introduction to parasitic plants. In: M. C. Press und Graves, J. D. (Hrsg.), *Parasitic Plants*. Chapman & Hall Ltd., London, UK, S. 1-13.
- Nefkens, G. H. L., Thuring, J. W. J. F., Beenackers, M. F. M. und Zwanenburg B. (1997) Synthesis of a phthaloylglycine-derived strigol analogue and its germination stimulatory activity towards seeds of the parasitic weeds *Striga hermonthica* and *Orobanch*e *crenata*. *J Agric Food Chem* **45**: 2273-2277.
- Nei, M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA* **70**: 3321-3323.
- Nei, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**: 583-590.
- Neukom, H. (1960) Über Farbreaktionen von Uronsäuren mit Thiobarbitursäure. *Chimia* **14**: 165-167.
- Nicholson, R. L., Jamil, F. F., Snyder, B. A., Ling Lue, W. und Hipskind, J. (1988) Phytoalexin synthesis in juvenile sorghum leaf. *Physiol Mol Plant Pathol* **33**: 271-278.

- Nicholson, R. L., Kollipara, S. S., Vincent, J. R., Lyons, P. C. und Cadena-Gomez, G. (1987) Phytoalexin synthesis by the sorghum mesocotyl in response to infection by pathogenic and nonpathogenic fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 5520-5524.
- Nickrent, D. L. und Duff, R. J. (1996) Molecular studies of parasitic plants using ribosomal RNA. In: M. T. Moreno, Cubero, J. I., Berner, D., Joel, D., Musselman, L. J. und Parker, C. (Hrsg.), Sixth International Parasitic Weed Symposium. Cordoba, Spanien, *Advances in Parasitic Plant Research*, S. 27-52.
- Nickrent, D. L., Musselman, L. J., Riopel, J. L. und Eplee, R. E. (1979) Haustorial initiation and non-host penetration in witchweed (*Striga asiatica*). *Ann Bot* **43**: 233-236.
- Okonkwo, S. N. C. (1964) *In vitro* culture of seedlings of *Striga senegalensis* Benth. *Nature* **204**: 1108-1109.
- Okonkwo, S. N. C. (1966a) Studies on *Striga senegalensis*. III. *In vitro* culture of seedlings. Establishment of cultures. *Am J Bot* **53**: 679-687.
- Okonkwo, S. N. C. (1966b) Studies on *Striga senegalensis*. IV. *In vitro* culture of seedlings. Effect of various sugars and glutamine. *Am J Bot* **53**: 687-693.
- Okonkwo, S. N. C. (1991) The germination of *Striga* - a review. Fifth International Symposium on Parasitic Weeds. Nairobi, Kenia, S. 144-154.
- Okonkwo, S. N. C. (1996) Aseptic culture of parasitic weeds - an overview. In: M. T. Moreno, Cubero, J. I., Berner, D., Joel, D., Musselman, L. J. und Parker, C. (Hrsg.), Sixth International Parasitic Weed Symposium. Cordoba, Spanien, *Advances in Parasitic Plant Research*, S. 283-292.
- Olivier, A., Glaszmann, J. C., Lanaud, C. und Leroux, G. D. (1998) Population structure, genetic diversity, and host specificity of the parasitic weed *Striga hermonthica* (*Scrophulariaceae*) in Sahel. *Plant Syst Evol* **209**: 33-45.
- Olivier, A., Ramaiah, K. V. und Leroux, G. D. (1991) Selection of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) varieties resistant to the parasitic weed *Striga hermonthica* (Del.) Benth. *Weed Res* **31**: 219-225.
- Paran, I., Gidoni, D. und Jacobsohn, R. (1997) Variation between and within broomrape (*Orobanche*) species revealed by RAPD markers. *Heredity* **1**: 68-74.

- Parker, C. (1984) The physiology of *Striga* spp.: present state of knowledge and priorities for future research. In: E. S. Ayensu, Doggett, H., Keynes, R. D., Marton-Lefevre, J., Musselman, L. J., Parker, C. und Pickering, A. (Hrsg.), *Striga* Biology and Control. ICSU Press, Paris, Frankreich, S. 179-189.
- Parker, C. (1987) *Striga*: scourge of sorghum. *Span* **30**: 29-31.
- Parker, C. und Reid, D. C. (1979) Host specificity in *Striga* species - some preliminary observations. In: L. J. Musselman, Worsham, A. D. und Eplee, R. E. (Hrsg.), Supplement to Proceedings of the Second International Symposium on Parasitic Weeds. North Carolina State University, Raleigh, NC, USA, S. 79-90.
- Parker, C. und Riches, C. R. (1993) Parasitic weeds of the world: biology and control. CAB International, Wallingford, UK.
- Patterson, D. T. (1987) Environmental factors affecting witchweeds growth and development. In: L. J. Musselman (Hrsg.), Parasitic Weeds in Agriculture. Volume 1. *Striga*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, S. 27-41.
- Pearson, H. H. W. (1913) On the problem of the witchweed. *Sci Bull* **40**: 1-34.
- Pieterse, A. H. (1979) The broomrapes (*Orobanchaceae*). A review. *Abstr Trop Agric* **5**: 9-35.
- Pieterse, A. H. (1996) The effect of nitrogen on *Orobanche* and *Striga* - state of the art. In: M. T. Moreno, Cubero, J. I., Berner, D., Joel, D., Musselman, L. J. und Parker, C. (Hrsg.), Sixth International Parasitic Weed Symposium. Cordoba, Spanien, Advances in Parasitic Plant Research, S. 273-282.
- Pieterse, A. H., Ebberts, A. E. H. und Pesch, C. J. (1984) A study on "wet dormancy" in seeds of *Striga hermonthica* (Del.) Benth. *in vitro*. Third International Symposium on Parasitic Weeds. Aleppo, Syrien, S. 99-107.
- Pieterse, A. H. und Pesch, C. J. (1983) The witchweeds (*Striga* spp.). A review. *Abstr Trop Agric* **9**: 9-37.
- Portnoy, V. H., Katzir, N. und Joel, D. M. (1997) Species identification of soil-borne *Orobanche* seeds by DNA fingerprinting. *Pestic Biochem Physiol* **58**: 49-54.
- Press, M. C., Graves, J. D. und Stewart, G. R. (1990) Physiology of the interaction of angiosperm parasites and their higher plant hosts. *Plant Cell Environ* **13**: 91-104.

- Press, M. C., Nour, J. J., Bebawi, F. F. und Stewart, G. R. (1989) Antitranspirant-induced heat stress in the parasitic plant *Striga hermonthica* - a novel method of control. *J Exp Bot* **40**: 585-591.
- Press, M. C., Shah, N., Tuohy, J. M. und Stewart, G. R. (1987) Carbon isotope ratios demonstrate carbon flux from C4 host to C3 parasite. *Plant Physiol* **85**: 1143-1145.
- Ramaiah, K. V. (1987) Breeding cereal grains for resistance to witchweed. In: L. J. Musselman (Hrsg.), *Parasitic Weeds in Agriculture. Volume 1. Striga*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, S. 227-242.
- Ramaiah, K. V., Chidley, V. L. und House, L. R. (1990) Inheritance of *Striga* seed-germination stimulant in sorghum. *Euphytica* **45**: 33-38.
- Ramaiah, K. V. und Parker, C. (1982) *Striga* and other weeds in sorghum. In: House *et al.* (Hrsg.), *International Symposium on Sorghum, Sorghum in the Eighties*, S. 291.
- Raynal-Roques, A. (1987) The genus *Striga* (*Scrophulariaceae*) in Western and Central Africa - a survey. In: H. C. Weber und Forstreuter, W. (Hrsg.), *4th Int. Symposium on Parasitic Flowering Plants (ISPFP)*. Marburg, S. 675-689.
- Raynal-Roques, A. (1994) Major, minor and potential parasitic weeds in semi-arid tropical Africa; the example of *Scrophulariaceae*. In: A. H. Pieterse, Verkleij, J. A. C. und Borg, S. J. ter (Hrsg.), *Third International Workshop on Orobanche and Related Striga Research*. Royal Tropical Institute, Amsterdam, NL, *Biology and Management of Orobanche*.
- Raynal-Roques, A. (1996) An hypothetic history of *Striga*: a preliminary draft. In: M. T. Moreno, Cubero, J. I., Berner, D., Joel, D., Musselman, L. J. und Parker, C. (Hrsg.), *Sixth International Parasitic Weed Symposium*. Cordoba, Spanien, *Advances in Parasitic Plant Research*, S. 105-111.
- Reda, F., Butler, L. G., Ejeta, G. und Ransom, J. K. (1994) Screening of maize genotypes for low *Striga asiatica* stimulant production using the "agar gel technique". *Afr Crop Sci J* **2**: 173-177.
- Reddy, K. C., Visser, P. L., Klaij, M. C. und Renard, C. (1994) The effects of sole and traditional intercropping of millet and cowpea on soil and crop productivity. *Exp Agric* **30**: 83-88.
- Riches, C. R. und Parker, C. (1995) Parasitic plants as weeds. In: M. C. Press und Graves, J. D. (Hrsg.), *Parasitic Plants*. Chapman & Hall Ltd., London, New York, S. 226-255.

- Riopel, J. L., Baird, W. V., Chang, M. und Lynn, D. G. (1986) Regulation of early development in witchweed (*Striga asiatica*) and other parasitic plants. In: S. J. ter Borg (Hrsg.), Proceedings of the Workshop on Biology and Control of *Orobanchae*. Wageningen, NL, S. 52-56.
- Riopel, J. L. und Musselman, L. J. (1979) Experimental initiation of haustoria in *Agalinis purpurea* (*Scrophulariaceae*). Am J Bot **66**: 570-575.
- Riopel, J. L. und Timko, M. P. (1995) Haustorial initiation and differentiation. In: M. C. Press und Graves, J. D. (Hrsg.), Parasitic Plants. Chapman & Hall Ltd., London, UK, S. 39-79.
- Saghai-Marooof, M. A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A. und Allard, R. W. (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proc Natl Acad Sci USA **81**: 8014-8018.
- Sahai, A. und Shivanna, K. R. (1982) Seed germination and seedling morphogenesis in parasitic angiosperms of the families *Scrophulariaceae* and *Orobanchaceae*. Seed Sci Tech **10**: 565-583.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science **239**: 487-491.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. und Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of  $\beta$ -Globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science **230**: 1350-1354.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning – A Laboratory Manual. 2. Ausg. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, S. E.5.
- Saunders, A. R. (1933) Studies in phanerogamic parasitism with particular reference to *Striga lutea* Lour. Sci Bull Dept Agric South Afr **128**: 86 pp.
- Savard, M. E., Miller, J. D., Ciotola, M. und Watson, A. K. (1997) Secondary metabolites produced by a strain of *Fusarium oxysporum* used for *Striga* control in West Africa. Biocontr Sci Tech **7**: 61-64.
- Schoen, D. J. und Brown, A. H. D. (1991) Intraspecific variation in population gene diversity and effective population size correlates with the mating system in plants. Proc Natl Acad Sci USA **88**: 4494-4497.



- Shah, N., Smirnoff, N. und Stewart, G. R. (1987) Photosynthesis and stomatal characteristics of *Striga hermonthica* in relation to its parasitic habit. *Physiol Plant* **69**: 699-703.
- Sherwood, R. T. (1966) Pectin lyase and polygalacturonase production by *Rhizoctonia solani* and other fungi. *Phytopathology* **56**: 279-286.
- Shomer-Ilan, A. (1993) Germinating seeds of the root parasite *Orobanchae aegyptiaca* Pers. excrete enzymes with carbohydrase activity. *Symbiosis* **15**: 61-70.
- Shomer-Ilan, A. (1994) Enzymes that degrade cell wall components are excreted by the haustorium of *Orobanchae aegyptiaca* Pers. Proceedings of the Third International Workshop on *Orobanchae* and Related *Striga* Research. Royal Tropical Institute, Amsterdam, NL, S. 255-259.
- Siame, B. A., Weerasuriya, Y., Wood, K., Ejeta, G. und Butler, L. G. (1993) Isolation of strigol, a germination stimulant for *Striga asiatica*, from host plants. *J Agric Food Chem* **41**: 1486-1491.
- Smith, L. H., Dudley, M. W. und Lynn, D. G. (1990) Vegetative/parasitic transition: control and plasticity in *Striga* development. *Plant Physiol* **93**: 208-215.
- Smith, S. und Stewart, G. R. (1990) Stomatal control of gas exchange in the hemi-parasite *Striga hermonthica*. *J Exp Bot* **41**: 4-5.
- Stakman, E. C. (1915) Relation between *Puccinia graminis* and plants highly resistant to its attack. *J Agric Res* **4**: 193-200.
- Starr, M. P. (1975) A generalized scheme for classifying organismic associations. *Symbiosis* (Symposia of the Society for Experimental Biology XXIX). Cambridge University Press, Cambridge, UK, S. 1-20.
- Stewart, G. R. (1987) Physiological biochemistry of *Striga*. In: L. J. Musselman (Hrsg.), *Parasitic Weeds in Agriculture. Volume 1. Striga*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, S. 77-88.
- Stewart, G. R., Graves, J. und Press, M. (1989) Vampires and witches - the physiology of parasitic flowering plants. *Plants Today* **9-10**: 159-165.
- Taylor, A., Martin, J. und Seel, W. E. (1996) Physiology of the parasitic association between maize and witchweed (*Striga hermonthica*): Is ABA involved? *J Exp Bot* **47**: 1057-1065.

- Thuring, J. W. J. F., Nefkens, G. H. L. und Zwanenburg, B. (1997) Asymmetric synthesis of all stereoisomers of the strigol analogue GR24. Dependence of absolute configuration on stimulatory activity of *Striga hermonthica* and *Orobancha crenata* seed germination. J Agric Food Chem **45**: 2278-2283.
- Torres, R. und Hemleben, V. (1991) Use of ribosomal DNA spacer probes to distinguish cultivars of *Cucurbita pepo* L. and other *Cucurbitaceae*. Euphytica **53**: 11-17.
- Torres-Ruiz, R. A. und Hemleben, V. (1994) Pattern and degree of methylation in ribosomal RNA genes of *Cucurbita pepo* L. Plant Mol Biol **26**: 1167-1179.
- Vallance, K. B. (1950) Studies on the germination of the seeds of *Striga hermonthica*. I. The influence of moisture treatment, stimulant dilution and after-ripening on germination. Ann Bot **14**: 347-363.
- Vallance, K. B. (1951) Studies on the germination of the seeds of *Striga hermonthica*. III. On the nature of pretreatment and after-ripening. Ann Bot **15**: 109-128.
- Vasudeva Rao, M. J. und Musselman, L. J. (1987) Host specificity in *Striga* spp. and physiological "strains". In: L. J. Musselman (Hrsg.), Parasitic Weeds in Agriculture. Volume 1. *Striga*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, S. 13-25.
- Verkleij, J. A. C., Luttikholt, L., Yèhouénou, A., Egbers, W. S. und Pieterse, A. H. (1994) Interaction between N-fertilizer and the parasitic weed *Striga hermonthica* (Del.) Benth. Proceedings of the Third International Workshop on *Orobancha* and Related *Striga* Research. Royal Tropical Institute, Amsterdam, NL, S. 520-527.
- Vogler, R. K., Ejeta, G. und Butler, L. G. (1996) Inheritance of low production of *Striga* germination stimulant in sorghum. Crop Sci **36**: 1185-1191.
- Ward, H. M. (1905) Recent researches on the parasitism of fungi. Ann Bot **19**: 1-54.
- Weber, H. C. (1993) Parasitismus von Blütenpflanzen. Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt.
- Weerasuriya, Y., Siame, B. A., Hess, D., Ejeta, G. und Butler, L. G. (1993) Influence of conditions and genotype on the amount of *Striga* germination stimulants exuded by roots of several host crops. J Agric Food Chem **41**: 1492-1496.
- Wegmann, K. (1986) Biochemistry of osmoregulation and possible reasons of resistance against *Orobancha*. In: S. J. ter Borg (Hrsg.), Proceedings of the Workshop on Biology and Control of *Orobancha*. Wageningen, NL, S. 107-113.

- Wegmann, K. (1996) Biochemistry of host/parasite relations. In: M. T. Moreno, Cubero, J. I., Berner, D., Joel, D., Musselman, L. J. und Parker, C. (Hrsg.), Sixth International Parasitic Weed Symposium. Cordoba, Spanien, Advances in Parasitic Plant Research, Suppl.
- Wegmann, K. (1998) Progress in *Orobanche* research during the past decade. In: K. Wegmann, Musselman, L. J. und Joel, D. M. (Hrsg.), Proceedings of the Fourth International Workshop on *Orobanche*. Albena, Bulgaria, Current Problems in *Orobanche* Researches, S. 13-17.
- Wegmann, K., Elert, E. von, Harloff, H. J. und Stadler, M. (1991) Tolerance and resistance to *Orobanche*. In: K. Wegmann und Musselman, L. J. (Hrsg.), Progress in *Orobanche* Research. Eberhard-Karls-Universität, Tübingen, S. 318-321.
- Weising, K., Ramloch, B. F. K., Kahl, G. und Epplen, J. T. (1989a) Oligonucleotide fingerprinting in angiosperms. Fingerprinting News **2**: 5-9.
- Weising, K., Ramser, J., Kaemmer, D., Kahl, G. und Epplen, J. T. (1991) Oligonucleotide fingerprinting in plants and fungi. In: Burke *et al.* (Hrsg.), International Symposium. Bern, Schweiz, Experientia Supplementum (Basel), Vol. 58, Fingerprinting: Approaches and Applications, S. 312-329.
- Weising, K., Weigand, F., Driesel, A. J., Kahl, G., Zischler, H. und Epplen, J. T. (1989b) Polymorphic simple GATA/GACA repeats in plant genomes. Nucleic Acids Res **17**: 10128.
- Welsh, J. und McClelland, M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res **18**: 7213-7218.
- Wigchert, S. C. M. und Zwanenburg, B. (1999) A critical account on the inception of *Striga* seed germination. J Agric Food Chem **47**: 1320-1325.
- Williams, J. G. K., Hanafey, M. K., Rafalski, J. A. und Tingey, S. V. (Hrsg.) (1993) Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. und Tingey, S. V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res **18**: 6531-6536.
- Wilson Jones, K. (1955) Further experiments on witchweed control. II. The existence of physiological strains of *Striga hermonthica*. Emp J Exp Agric **23**: 206-213.

- Wollenberg, R. (1998) Versuche zur Charakterisierung der Wurzelexsudate verschiedener Varietäten von *Sorghum bicolor* (L.) Moench wegen ihrer Bedeutung für die Parasitierung durch *Striga hermonthica* (Del.) Benth. Diplomarbeit, Inst. f. Pflanzenbiochemie, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.
- Worsham, A. D. (1987) Germination of witchweed seeds. In: L. J. Musselman (Hrsg.), Parasitic Weeds in Agriculture. Volume 1. *Striga*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, S. 45-61.
- Worsham, A. D., Moreland, D. E. und Klingman, G. C. (1959) Stimulation of *Striga asiatica* (witchweed) seed germination by 6-substituted purines. *Science* **130**: 1654-1656.
- Yoneyama, K., Ogasawara, M., Takeuchi, Y., Konnai, M., Sugimoto, Y., Seto, H. und Yoshida, S. (1998) Effect of jasmonates and related compounds on seed germination of *Orobancha minor* Smith. and *Striga hermonthica* (Del.) Benth. *Biosci Biotech Biochem* **62**: 1448-1450.
- Yoshikawa, F., Worsham, A. D., Moreland, D. E. und Eplee, R. E. (1978) Biochemical requirements for seed germination and shoot development of witchweed (*Striga asiatica*). *Weed Sci* **26**: 119-122.
- Zeid, M., Madkour, M., Koraiem, Y., Nawar, A., Soliman, M. und Zaitoun, F. (1997) Molecular studies on *Orobancha*. *J Phytopathol* **145**: 351-355.

## 9 VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN

### 9.1 Abbildungen

- Abb. 1-1: Verbreitung von *Striga hermonthica* – Hauptverbreitungsgebiete schwarz gefärbt (nach MUSSELMAN *et al.* 1988).
- Abb. 1-2: *Striga hermonthica* (Del.) Benth.
- Abb. 1-3: Lebenszyklus von *Striga hermonthica* – Wirt-Parasit-Wechselwirkungen.
- Abb. 1-4: Molekülstrukturen verschiedener Keimungsstimulantien von *Striga* spp.
- Abb. 1-5: Molekülstrukturen der Phytoalexine verschiedener Pflanzen – aus Kichererbse (*Cicer arietinum*) **1**) Medicarpin und **2**) Maackiain, aus Sonnenblume (*Helianthus annuus*) **3**) Scopoletin und aus Sorghum (*Sorghum bicolor*) **4**) Apigeninidin (R=H) und Luteolinidin (R=OH).
- Abb. 1-6: Herkunft der in den Untersuchungen verwendeten Samen von *Striga hermonthica* – Herkunftsländer auf dem afrikanischen Kontinent sind grau unterlegt, dazu Jemen.
- Abb. 3-1: Vitalitätsnachweis von Samen mit dem TTC-Test – Reduktion des farblosen TTC zum roten Formazan.
- Abb. 3-2: Struktur DIG-markierter Nukleotide – als Beispiel alkali-stabiles dUTP (R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = OH).
- Abb. 3-3: PCR-Temperaturprofil.
- Abb. 4-1: Endocellulase (EC 3.2.1.4)-Aktivität beeinflusst durch Sorghum-Wurzelexsudat.
- Abb. 4-2: Endoxylanase (EC 3.2.1.8)-Aktivität beeinflusst durch Sorghum-Wurzelexsudat.
- Abb. 4-3:  $\beta$ -Glucosidase (EC 3.2.1.21)-Aktivität beeinflusst durch Sorghum-Wurzelexsudat.
- Abb. 4-4: Polygalacturonase (EC 3.2.1.15)-Aktivität beeinflusst durch Sorghum-Wurzelexsudat.
- Abb. 4-5: Bioautographie – Biotest auf DC-Platte (keine dünnschichtchromatographische Trennung).
- Abb. 4-6: <sup>13</sup>C-Festkörper-NMR-Spektren (300 MHz) von Lignin (aus Fichtenholz als Standard) und Wurzelproben verschiedener *Sorghum bicolor*-Varietäten (junge Wurzeln, pulverisiert).
- Abb. 4-7: <sup>13</sup>C-Festkörper-NMR-Spektren (300 MHz) von Wurzelproben verschiedener *Sorghum bicolor*-Varietäten (junge Wurzeln, pulverisiert).
- Abb. 4-8: Konditionierung von *Striga hermonthica*-Samen – Keimungsrate *S. hermonthica*-Samen aus Mali 95 (M/95) in Abhängigkeit von der Konditionierungsdauer.
- Abb. 4-9: Induktion der Keimung von *Striga hermonthica*-Samen aus Mali 95 (M/95) mit GR 24-Lösungen verschiedener Konzentration.
- Abb. 4-10: Keimungsrate von *Striga hermonthica*-Samen aus Mali 95 (M/95) in Abhängigkeit von der Zahl an Samen im Testansatz.
- Abb. 4-11: Infektionseffizienz im Topfversuch von zwei *Striga hermonthica*-Herkünften auf der suszeptiblen *Sorghum bicolor*-Varietät CSM-209 bei unterschiedlicher *Striga*-Samenvorbehandlung.
- Abb. 4-12: *Striga hermonthica* – Attachment in Cokultur mit der *Sorghum bicolor*-Varietät N-13.
- Abb. 4-13: *In vitro*-Kulturen von *Striga hermonthica* der Herkunft Mali 95 (M/95).
- Abb. 4-14: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *Striga hermonthica*-Samen verschiedener Herkünfte (Vergrößerung  $\approx$  5000fach).
- Abb. 4-15: RFLP-Bandenmuster – Gesamt-DNA aus *Striga hermonthica* verschiedener Herkünfte.
- Abb. 4-16: PCR-Temperaturprofil.
- Abb. 4-17: PCR-Bandenmuster mit Primer STR-R1 – DNA einzelner *Striga hermonthica*-Pflanzen.
- Abb. 4-18: PCR-Bandenmuster mit Primer STR-R2 – DNA einzelner *Striga hermonthica*-Pflanzen.
- Abb. 4-19: PCR-Bandenmuster mit Primer STR-R6 – DNA einzelner *Striga hermonthica*-Pflanzen.

- Abb. 4-20: PCR-Bandenmuster mit Primer STR-R12 – DNA einzelner *Striga hermonthica*-Pflanzen.
- Abb. 4-21: PCR-Bandenmuster mit Primer STR-R13 – DNA einzelner *Striga hermonthica*-Pflanzen (Gelausschnitte).
- Abb. 4-22: PCR-Bandenmuster mit Primer STR-R14 – DNA einzelner *Striga hermonthica*-Pflanzen.
- Abb. 4-23: PCR-Bandenmuster mit Primer STR-R15 – DNA einzelner *Striga hermonthica*-Pflanzen (Gelausschnitte).
- Abb. 4-24: Dendrogramm nach *UPGMA* (50 % Konsensus; 100 Replikationen) – Baumteil 1.
- Abb. 4-25: Dendrogramm nach *UPGMA* (50 % Konsensus; 100 Replikationen) – Baumteil 2.
- Abb. 4-26: Dendrogramm nach *MP* (50%iger Konsensusbaum aus 2000 Bäumen) – Baumteil 1.
- Abb. 4-27: Dendrogramm nach *MP* (50%iger Konsensusbaum aus 2000 Bäumen) – Baumteil 2.
- Abb. 4-28: Dendrogramm von zwanzig *Striga hermonthica*-Populationen verschiedener Herkünfte basierend auf der genetischen Distanz (NEI 1978) – Methode *UPGMA*.
- Abb. 4-29: Konzentrierung von keimungsinduzierenden Lösungen durch Lyophilisieren am Beispiel des Keimungsstimulans GR 24.
- Abb. 4-30: Keimungstest auf DC-Platte – Verbreiterung.
- Abb. 4-31: Identifizierung von Keimungsstimulantien – Dünnschichtchromatographische Trennung mit anschließendem Biotest.

## 9.2 Tabellen

- Tab. 1-1: Elicitoren und Streßfaktoren – Beispiele.
- Tab. 2-1: Saatgut verschiedener Varietäten von Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) – Herkunft und Eigenschaften.
- Tab. 2-2: Saatgut verschiedener Varietäten von Pearl-Millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) – Herkunft und Eigenschaften.
- Tab. 2-3: Samen von *Striga hermonthica* (Del.) Benth. – verschiedene Herkünfte.
- Tab. 2-4: RFLP-Sonden – Eigenschaften.
- Tab. 2-5: 10mer-Primer für die RAPD-PCR-Versuche.
- Tab. 2-6: Enzyme für Exoenzym-Aktivitätstests.
- Tab. 4-1: Keimungsraten der Samen der Sorghum (*Sorghum bicolor*)- und Pearl-Millet (*Pennisetum glaucum*)-Varietäten im Petrischalenversuch.
- Tab. 4-2: Anteil der im TTC-Test positiven Samen der Sorghum-Varietät N-13.
- Tab. 4-3: Frischgewichte der zur Exsudatgewinnung verwendeten Wurzeln der verschiedenen *Sorghum bicolor*-Varietäten.
- Tab. 4-4: Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Wurzelextrakten „resistenter“ Sorghum-Varietäten nach unterschiedlicher Behandlung – Bandencharakteristika.
- Tab. 4-5: Anteil der im TTC-Test positiven Samen von *Striga hermonthica* der Herkunft Mali 95 (M/95).
- Tab. 4-6: Regeneration von Sproßabschnitten von *Striga hermonthica* aus Mali 95 (M/95) *in vitro* auf MS-Nährmedien mit Hormonzusätzen von Gibberellinsäure (GA<sub>3</sub>) und Indolessigsäure (IES) in verschiedenen Konzentrationen.
- Tab. 4-7: Samenkeimung und erste Entwicklung von *Striga hermonthica* aus Mali 95 (M/95) und Kenia 94 (K/94) auf verschiedenen Kulturmedien.
- Tab. 4-8: Taxonomische Untersuchung der *Striga hermonthica*-Pflanzen der Herkünfte Mali 95 (M/95) und Kenia 94 (K/94) – Blütenmerkmale (nach Teryokhin).
- Tab. 4-9: *Striga hermonthica*-Herkünfte, untersucht mittels RAPD-PCR-Methode.
- Tab. 4-10: Komponenten eines PCR-Ansatzes.

- Tab. 4-11: Ausgewählte 10mer-Primer für die phylogenetischen Untersuchungen – Sequenzen und Zahl ausgewerteter RAPD-Banden.
- Tab. 4-12: Gendiversität  $h$  nach NEI (1973) von zwanzig *Striga hermonthica*-Populationen verschiedener Herkünfte ermittelt unter Verwendung des Computerprogramms *Popgene*.
- Tab. 4-13: Genetische Distanz und genetische Identität ohne zusätzliche Randbedingungen (*unbiased*) nach NEI (1978) von zwanzig *Striga hermonthica*-Populationen verschiedener Herkünfte ermittelt unter Verwendung des Programms *Popgene*.
- Tab. 4-14: Identifizierung von Keimungsstimulantien mittels Dünnschichtchromatographie – Fluoreszenzlöschung des Indikators der stationären Phase unter UV-Licht bei  $\lambda = 254$  nm.
- Tab. 4-15: Identifizierung von Keimungsstimulantien im DC-Biotest – Keimungsstimulans GR 24 und Millet-Wurzelexsudate.
- Tab. 4-16: Identifizierung von Keimungsstimulantien im DC-Biotest – Sorghum-Wurzelexsudate.
- Tab. 4-17: Identifizierung von Keimungsstimulantien im DC-Biotest – Sorghum-Wurzelexsudate.
- Tab. 4-18: Identifizierung von Keimungsstimulantien im DC-Biotest – Sorghum-Wurzelexsudate.
- Tab. 4-19: Identifizierung von Keimungsstimulantien im DC-Biotest – Sorghum-Wurzelexsudate.
- Tab. 7-1: DNA-Proben aus Blattmaterial von *Striga hermonthica* (Del.) Benth. für die RAPD-PCR – Beschreibungen der Herkünfte.
- Tab. 7-2: RAPD-PCR-Bandenauswertung – Teil 1 – Primer 1/1 bis 12/5.
- Tab. 7-3: RAPD-PCR-Bandenauswertung – Teil 1 – Primer 12/6 bis 15/5.
- Tab. 7-4: RAPD-PCR-Bandenauswertung – Teil 2 – Primer 1/1 bis 12/5.
- Tab. 7-5: RAPD-PCR-Bandenauswertung – Teil 2 – Primer 12/6 bis 15/5.
- Tab. 7-6: RAPD-PCR-Bandenauswertung – Teil 3 – Primer 1/1 bis 12/5.
- Tab. 7-7: RAPD-PCR-Bandenauswertung – Teil 3 – Primer 12/6 bis 15/5.





## **Meine akademischen Lehrerinnen und Lehrer waren**

an den Universitäten Bayreuth und Tübingen:

Alt, Bauer, Beck, Bentrop, Blatz, Braun, Drake, Ejchart, Eska, Faulhammer, Fischer, Frunzke, Gerlach, Hölzel, Hoffmann, Jensen, Klautke, Kleiner, Klingmüller, Komor, G. Krauss, H. L. Krauss, Meyer, Morys, Reiner, Richter, Rösch, Scheibe, Schmid, Schreyer, Schumann, Seifert, Spittler, Sprinzel, Ulbricht, Wegmann, Wokaun, Wrackmeyer.



## Lebenslauf

Name: Rainer Heller  
Geburtsdatum: 3. September 1968  
Geburtsort: Frankfurt am Main

Schul Ausbildung:  
1975–1979 Grundschule, Dahlmannschule in Frankfurt am Main  
1979–1988 Gymnasium, Helmholtzschule in Frankfurt am Main  
1988 Abitur

Wehrdienst:  
1988–1989 Grundwehrdienst in Warburg und Kassel

Studium:  
1989–1995 Studium der Biochemie an der Universität Bayreuth  
1991 Vordiplom  
Mai-Dez. 1994 Diplomarbeit  
„Homo- und heteronukleare NMR-Spektroskopie am [4Fe-4S]-Ferredoxin  
aus *Thermotoga maritima*“  
am Lehrstuhl für Struktur und Chemie der Biopolymere,  
Prof. Dr. Paul Rösch  
1994 Diplom (Dipl.-Biochem. Univ.)

Beschäftigung:  
1995–2001 Wissenschaftlicher Angestellter am  
Institut für Pflanzenbiochemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen,  
Arbeitskreis Prof. Dr. Dr. h. c. Klaus Wegmann  
Vorbereitung der Promotion –  
Anfertigung der Doktorarbeit mit dem Titel  
„*Striga*-Resistenz in *Sorghum bicolor* und genetische Variabilität von  
*Striga hermonthica*“  
unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. h. c. Klaus Wegmann  
am Institut für Pflanzenbiochemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen