



Universität Hamburg

DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG

**Charakterisierung der Proteine Hex-1 und SO in
Fusarium graminearum und deren Einfluss auf
die vertikale Übertragung des Mykovirus
Fusarium graminearum Virus China 9 (FgV-ch9)**

Dissertation zur Erlangung der Würde des Doktors der
Naturwissenschaften

der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Biologie

der Universität Hamburg

Vorgelegt von

Mareike Jaeckel

Hamburg, Oktober 2023

Vorsitzender der Prüfungskommission: Prof. Dr. Stefan Hoth

1. Gutachterin: PD Dr. Cornelia Heinze

2. Gutachter: Prof. Dr. Dominik Begerow

Datum der Disputation: 01.03.2024

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1 Fusarium graminearum.....	1
1.1.1 Lebenszyklus.....	2
1.1.2 Bekämpfungsstrategien von FHB Epidemien mittels hypovirulenter Viren	4
1.2 Übertragung von Mykoviren	7
1.3 FgV-ch9 als Biozid zur Eindämmung von FHB-Epidemien.....	10
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	11
2. Material	13
2.1 Chemikalien.....	13
2.2 Organismen	13
2.2.1 Bakterienstämme	13
2.2.2 <i>Fusarium graminearum</i> -Stämme.....	14
2.2.3 Pflanzen.....	14
2.3 Medien.....	14
2.4 Antiseren	17
2.5 Synthetische Oligonukleotide (Primer).....	18
2.6 Plasmide	20
2.7 Software und Datenbanken.....	21
3. Methoden	22
3.1 Anzucht von <i>Fusarium graminearum</i>	22
3.1.1 Anzucht von Myzel auf Festmedium.....	22
3.1.2 Anzucht von Myzel in Flüssigmedium.....	22
3.1.3 Anzucht von Konidien auf Festmedium	22
3.1.4 Anzucht von Konidien auf Flüssigmedium.....	23
3.2 Extraktion von FgV-ch9 Polysomen	23
3.3 Infektion von <i>Fusarium graminearum</i> mit dem Virus FgV-ch9.....	24
3.3.1 Infektion über Ko-Kultivierung	24
3.3.2 Infektion über Kondienmischung	24
3.4 Klonierungsmethoden	25
3.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	25
3.4.2 cDNA Synthese mittels reverser Transkription	26
3.4.3 Agarose-Gelelektrophorese.....	27

INHALTSVERZEICHNIS

3.4.4	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	27
3.4.5	Restriktionsverdau von DNA	28
3.4.6	Modifikation von DNA-Fragmenten.....	29
3.4.7	Reinigung von DNA-Fragmenten	29
3.4.8	Fällung von DNA-Fragmenten.....	29
3.4.9	Photometrische Konzentrationsbestimmungen	30
3.4.10	Ligation von Fragmenten	30
3.4.11	Transformation in <i>E. coli</i>	30
3.4.12	DNA-Sequenzierung.....	31
3.4.13	Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i>	31
3.5	Herstellung und molekulare Analyse pilzlicher Transformanten.....	31
3.5.1	Protoplasten-Transformation von <i>Fusarium graminearum</i>	31
3.5.2	Phire PCR.....	32
3.5.3	DNA-Extraktion mittels CTAB	33
3.5.4	Southern Blot.....	34
3.5.5	RNA-Extraktion aus Myzel.....	37
3.5.6	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	38
3.5.7	Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR).....	40
3.6	Phänotypische Analyse pilzlicher Transformanten	41
3.6.1	Wachstumstest auf Festmedium	41
3.6.2	Perithezienproduktion.....	41
3.6.3	Infektionsstudien auf Weizenähren.....	41
3.6.4	Analyse von Infektionskissen auf Weizenähren	42
3.6.5	Auskeimungstest und Vereinzeln von Konidien	42
3.7	Fluoreszenzmikroskopie.....	43
3.7.1	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie.....	43
3.7.2	Fluoreszenzmikroskopie am Axio Imager Z1.....	43
3.8	Statistische Auswertung.....	43
3.9	Phylogenetische Analyse.....	44
4.	Ergebnisse	45
4.1	Identifizierung von Hex-1 und SO	45
4.2	Klonierungs- und Transformationsstrategien.....	47
4.2.1	Herstellung der <i>pks12</i> Deletionsmutante <i>FgΔpks12</i>	48
4.2.2	Herstellung der <i>hex-1</i> Deletionsmutane <i>FgΔhex-1</i>	51
4.2.3	Herstellung der <i>so</i> Deletionsmutante <i>FgΔso</i>	53

INHALTSVERZEICHNIS

4.2.4	Herstellung der <i>hex-1/so</i> Deletionsmutante <i>FgΔhex-1/Δso</i>	56
4.2.5	Herstellung der GFP-markierten <i>hex-1</i> Überexpressionsmutante <i>Fg_{OE}hex-1</i>	57
4.2.6	Herstellung der regulierbaren mCherry markierten <i>so</i> Überexpressionsmutante <i>Fg_{so}</i>	61
4.2.7	Herstellung der mCherry-markierten Mutante <i>Fg_{nativso}</i>	65
4.3	Einfluss von Hex-1 und SO auf die horizontale und vertikale Ausbreitung.....	69
4.3.1	Virusinfektionen von Hex-1 Überexpression und Deletion sowie SO Überexpression waren erfolgreich.....	69
4.3.2	SO-Deletionsmutanten konnten über die Kontrolle des regulierbaren Promoter <i>Tcu</i> indirekt infiziert werden	69
4.3.3	Die Virusinfektion hat keinen Einfluss auf die Transkriptionslevel von Hex-1 und SO.....	70
4.3.4	Die Virusinfektion ist in den Mutanten stabil	71
4.3.5	Unabhängige Virusinfektionen resultieren in Kulturen mit hoher und niedriger Viruslast	72
4.3.6	Der Anteil virusinfizierter Konidien ist bei niedriger Viruslast des Ausgangsmyzels höher als bei hoher Viruslast des Ausgangsmyzels.....	75
4.4	Charakterisierung der Mutanten zur Analyse der Funktion der deletierten und überexprimierten Gene in <i>F. graminearum</i>	78
4.4.1	Hex-1 aggregiert in der Nähe der Septumsporen und SO akkumuliert an den Hyphenspitzen.....	78
4.4.2	Die Deletion von SO führt zu weniger stark verzweigtem Myzel	82
4.4.3	Untersuchung zur Sporenbildungs- und Keimungsfähigkeit.....	82
4.4.3.1	Die Mutationen haben keinen Einfluss auf die Bildung und Keimungsfähigkeit von Konidien	83
4.4.3.2	Die Bildung von Perithezien ist abhängig von SO aber nicht von Hex-1 oder einer Virusinfektion	84
4.4.4	Wachstumstest der <i>F. graminearum</i> Mutanten	85
4.4.5	Ein deletiertes oder herabreguliertes <i>so</i> Gen aber nicht eine Hex-1-Deletion führt zu einer verminderten Infektiosität	89
4.4.5.1	Mutanten mit reduziertem oder fehlendem <i>so</i> zeigen eine verlangsamte Ausbreitung innerhalb der Weizenähre	92
4.4.5.2	In Infektionen mit Mutanten mit reduziertem oder fehlendem SO werden weniger Infektionsstrukturen gebildet.....	97
5.	Diskussion	99
5.1	Virus ist ungleich im Myzel verteilt	100
5.2	Die Deletion des Hex-1 Proteins führt zu einer verzögerten Ausbreitung des Myzels in Weizen	105

INHALTSVERZEICHNIS

5.3	Hex-1 ist kein Wirtsfaktor für FgV-ch9	107
5.4	Zusammenfassung Hex-1	108
5.5	Das SO Protein ist in <i>F. graminearum</i> essentiell für die Bildung von Anastomosen, Perithezien und Appressorien.....	109
5.6	SO hat als Wirtsfaktor einen positiven Einfluss auf die Ausbreitungseffizienz von FgV-ch9.....	112
5.7	Zusammenfassung SO	116
5.8	Fazit.....	116
6.	Zusammenfassung.....	118
7.	Summary.....	120
8.	Literaturverzeichnis.....	122
9.	Anhang.....	136
	Danksagung.....	164
	Eidesstattliche Versicherung.....	165

Abkürzungsverzeichnis

(+)ssRNA	Positiv-einzelsträngige Ribonukleinsäure
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
Amp	Ampicillin
ANOVA	Analysis of variance (Varianzanalyse)
bp	Basenpaare
CAT	conidial anastomosis tube (Konidien-Anastomose-Röhre)
C _{CM}	Cellophan-CM-Festmedium
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
CHV1	Cryphonectria Hypovirus 1
C _{ICM}	Cellophan Induktions-CM-Festmedium
CM	Komplettmedium
CSPD	Chemilumineszenz-Substrat (Disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo [3.3.1.13,7]decan}-4-yl)phenyl phosphate)
CWI	Cell Wall Integrity (Zellwand-Integritäts-(Signalweg))
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleinsäuretriphosphat
DON	Deoxynivalenol
dpi	days past infection (Tage nach Infektion)
dsRNA	Doppelsträngige Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	Enhanced green fluorescent protein (grün fluoreszierendes Protein)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Enzymgekoppeltes, immunologisches Nachweisverfahren)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	Und andere (et alii)
FgCh9	<i>Fusarium graminearum</i> China 9 Stamm
FgPH1	<i>Fusarium Graminearum</i> PH1 Stamm
FgV1	<i>Fusarium graminearum</i> Virus 1
FgV-ch9	<i>Fusarium graminearum</i> Virus-china 9
FHB	<i>Fusarium</i> Head Blight (Ährenbleiche)
gDNA	Genomische Desoxyribonukleinsäure
Gen	Geneticin
GS	Glycin-Serin-Linker
GTP	Guanidintriphosphat
Hex-1	Hexagonales Peroxisomen Protein 1
HygB	Hygromycin B
LAH	Leashin
LB	Lysogenie Brühe

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

LF	Left Flank (5' flankierende Region)
M	Marker
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mcs	multiple cloning site (Polylinker)
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
Nat	Nourseothricin
NK	Negativkontrolle
nptII	Neomycin Hhosphotransferase II Enzym
ORF	Open Reading Frame (offener Leserahmen)
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCD	Programmed Cell Death (Programmierter Zelltod)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PK	Positivkontrolle
Pks12	Polyketid-Synthase Gen
PTS1	peroxisomal targeting sequence(Peroxisomale Erkennungssequenz 1)
qRT-PCR	Quantitative Real-Time PCR (Quantitative Echtzeit PCR)
RdRP	RNA-abhängigen RNA-Polymerase
RF	Right Flank (3' flankierende Region)
Rho GTPase	Ras-Homolog GTP-bindendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
ROS	Reactive oxigene species (Reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	rouns per minute
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SEL	size exclusion Limit
siRNA	short interfering RNA
SNA	Synthetischer Nährstoffarmer Agar
SO	SO (soft) Protein
SOB	Super Optimal Broth (Superoptimale Brühe)
SSC	Saline Sodium Citrate (Salzlösung Natriumcitrat)
SsHADV-1	Sclerotinia sclerotiorum Hypovirulenz-Assoziiertes DNA-Virus 1
TE-Puffer	TRIS-EDTA Puffer
TmpL	Transmembranprotein L
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
VF	Virusfrei
VGS	virus-induced host gene shutoff (virusinduzierte Abschaltung von Wirtsgenen)
VI	Virusinfiziert
ViS	Visible (sichtbares Licht)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

WSC	Woronin body sorting complex
WT	Wildtyp
YEPD-Medium	yeast extract peptone dextrose Medium (Hefeextrakt-Pepton-Dextrose-Medium)
α	alpha
β	beta
Δ	Delta (Deletion)

1. Einleitung

Im Juli 2023 fiel in Hamburg mit rund 115 Litern pro Quadratmeter knapp 30% mehr Niederschlag als im Mittel der vergangenen 60 Jahre, die Sonnenscheindauer und Temperaturen lagen jedoch im Mittel (Deutscher Wetterdienst, 2023). Das stellt nicht nur die Natur sondern auch Landwirte vor Herausforderungen, deren Ernteperiode von Winter- und Sommergetreide in der Regel von Mitte Juni bis Ende August dauert (AGRAVIS, 2023). Aufgrund der feuchten Wetterlage konnte bis Anfang August 2023 erst ein Fünftel der Weizenernte eingefahren werden, da bei Regen die Mähdrescher nicht ausfahren können (Deutscher Bauernverband, 2023). Zudem begünstigt dieses feuchtwarme Klima schwere, durch pathogene Pilze hervorgerufene Infektionskrankheiten. Phytopathogene Pilze sind bereits jetzt eine der dominantesten Schadorganismen und für nahezu 65% der Ernteauffälle bei Getreide, Obst und Gemüse verantwortlich (Deepa *et al.*, 2021; Fisher *et al.*, 2012). Da diese Wetterlagen auf Grund des Klimawandels immer häufiger der Fall sind, steigt die Anzahl an schweren Infektionskrankheiten in Nutzpflanzen immer weiter (Nazarov *et al.*, 2020).

In Getreidepflanzen sind neben *Magnaporthe oryzae*, dem Auslöser der Reisbrandkrankheit, vor allem verschiedene Arten von *Fusarium* die wichtigsten Schadorganismen.

1.1 *Fusarium graminearum*

Der Ascomyzet *Fusarium graminearum* (Hypocreales) ist der Auslöser der Ährenbleiche (*Fusarium Head Blight*, FHB) bei vielen Getreidepflanzen wie Weizen (Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.), Gerste und Reis sowie der Kolbenfäule (*ear rot*) bei Mais (Bal, 1994; McMullen *et al.*, 1997). Der Befall dieser Nutzpflanzen ist ein weltweites Problem mit schweren Ausbrüchen in Nord- und Südamerika, Asien und Europa. Durch FHB-Epidemien kann es zu Ernteverlusten von 10% - 70% und damit nicht nur zu weltweiten milliardenschweren Verlusten in der Agrarindustrie, sondern auch zu einer Gefährdung der Ernährungssicherheit kommen (Wilson *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2011).

Die Ährenbleiche führt in kurzer Zeit nicht nur zu einem massiven Ernte- sondern auch zu einem starken Qualitätsverlust. Eine Ähre mit typischen Symptomen von FHB ist in **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** gezeigt.

EINLEITUNG

Die primären wirtschaftlichen und gesundheitlichen Folgen einer Infektion sind auf die Kontamination mit dem Mykotoxin Deoxynivalenol (DON) zurückzuführen. Es gehört zur Gruppe der Trichothecene und ist ein Virulenzfaktor für *F. graminearum*, der dessen Ausbreitung auf Getreidepflanzen fördert. Bei Besiedelung auf Weizen führt die Anhäufung von DON zu kleineren, vertrockneten Körnern. Bei Aufnahme ausreichender Mengen kann das Verdauungssystem und die Funktion wichtiger Organe bei Menschen und Tieren beeinträchtigt werden, da DON ein wirksamer Inhibitor der Proteinbiosynthese ist (Council for Agricultural Science and Technology, 2003; Jansen *et al.*, 2005; Ponts, 2015). Auch Zearalenon, ein nicht-steroides Mykoöstrogen, das in hohen Dosierungen bei Nutztieren zu Fortpflanzungsproblemen führen kann, ist ein Problem in infizierter Ernte (Bennett & Klich, 2003; El-Nezami *et al.*, 2002).



Abbildung 1: Weizenähre mit typischen Symptomen einer Infektion mit *F. graminearum* im Vergleich mit einer nicht infizierten Ähre.

1.1.1 Lebenszyklus

Die Krankheit FHB wird dadurch ausgelöst, dass der Pilz in seiner sexuellen, dikaryotischen Form (*Giberella zea*) auf am Boden befindlichen Ernteresten von Weizen überwintert und im Frühling Fruchtkörper (Perithezien) bildet, die mit Asci gefüllt sind (**Abbildung 2**). Asci sind röhrenförmige Säcke, die die sexuell gebildeten Ascosporen enthalten und diese bei feuchtwarmer Witterung in die Luft schleudern (Ali, S., and L. Francl, 2001; Guenther & Trail, 2005; Trail, 2009) und unter anderem auf frisch erblühten Ährchen landen. Die offenen Blüten bieten hierbei eine optimale Möglichkeit, um mit den Karyopsen, den Deck- (Lemma) und Vorspelzen (Palea) in Kontakt zu treten, und über diese in die Blüte einzudringen (Kang & Buchenauer, 2000; Trail, 2009). Die Sporen keimen und bilden Laufhyphen aus wenig verzweigtem Myzel, wodurch sie sich schnell auf der Oberfläche des Gewebes ausbreiten. Zusätzlich wird nach Keimung der Sporen über die Wahrnehmung physikalischer und chemotropher Oberflächensignale der Pflanze die Bildung von Appressorien auslöst. Appressorien besitzen eine verdickte Zellwand, die es ihnen ermöglicht, einen hohen Turgordruck aufzubauen. Mittels des Turgordrucks und Zellwand degradierender Enzyme kann die

EINLEITUNG

neu gebildete Penetrationshyphne in die Pflanzenzelle getrieben werden (Braun & Howard, 1994; Mendgen *et al.*, 1996).

Die Hyphen verzweigen und differenzieren sich weiter und bilden im Verlauf der Infektion verschiedene Formen von komplexeren Infektionsstrukturen, die aus zusammengesetzten Appressorien bestehen. In Infektionsstrukturen bestehend unter anderem aus Infektionskissen, Infektionshyphen und Fußstrukturen wird das Mykotoxin DON gebildet, welches durch die Hemmung der Proteinbiosynthese der Wirtspflanze die Besiedelung des Wirts fördert (Boenisch & Schäfer, 2011).

Die Überwindung des Rachisknotens ist für die systemische Ausbreitung des Pilzes von entscheidender Bedeutung. Er markiert die Übergangszone zwischen Blüte und dem Leitgewebe der Weizenähren. Als Abwehrmechanismus produziert die Pflanze starke Zellwandverdickungen im Rachisknoten, um die Ausbreitung des Pilzes zu stoppen (Proctor *et al.*, 1995). Die Produktion der Zellwandverdickungen wird durch DON gehemmt, was es zu einem Virulenzfaktor, der für die Infektion unerlässlich ist, macht (Boenisch & Schäfer, 2011; Jansen *et al.*, 2005; Maier *et al.*, 2006). Nach erfolgreicher Invasion in tiefere Gewebeschichten, breitet sich der Pilz systemisch über die Leitbündel in die Rachis und Rachilla und von dort radial in weitere Ährchen aus (Jansen *et al.*, 2005; Ribichich *et al.*, 2000).

Nekrotisches und chlorotisches Gewebe sowie das vorzeitige Bleichen der Ähren in infizierten Bereichen sind die Folge dieser systemischen Ausbreitung (Brown *et al.*, 2010; Goswami & Kistler, 2004). Auf der Pflanzenoberfläche bildet sich zudem Luftmyzel und Konidien (asexuelle Sporen) werden produziert. Diese können innerhalb einer Vegetationsperiode weitere Weizenpflanzen infizieren und so zu schweren FHB-Epidemien führen (Goswami & Kistler, 2004; Trail, 2009).

Nach der Ernte und am Ende der Vegetationsperiode überwintert *F. graminearum* wieder in seiner sexuellen Form *G. zea* auf Ernteresten. Eine Übersicht des Infektionszyklus ist in **Abbildung 2** gezeigt.

EINLEITUNG

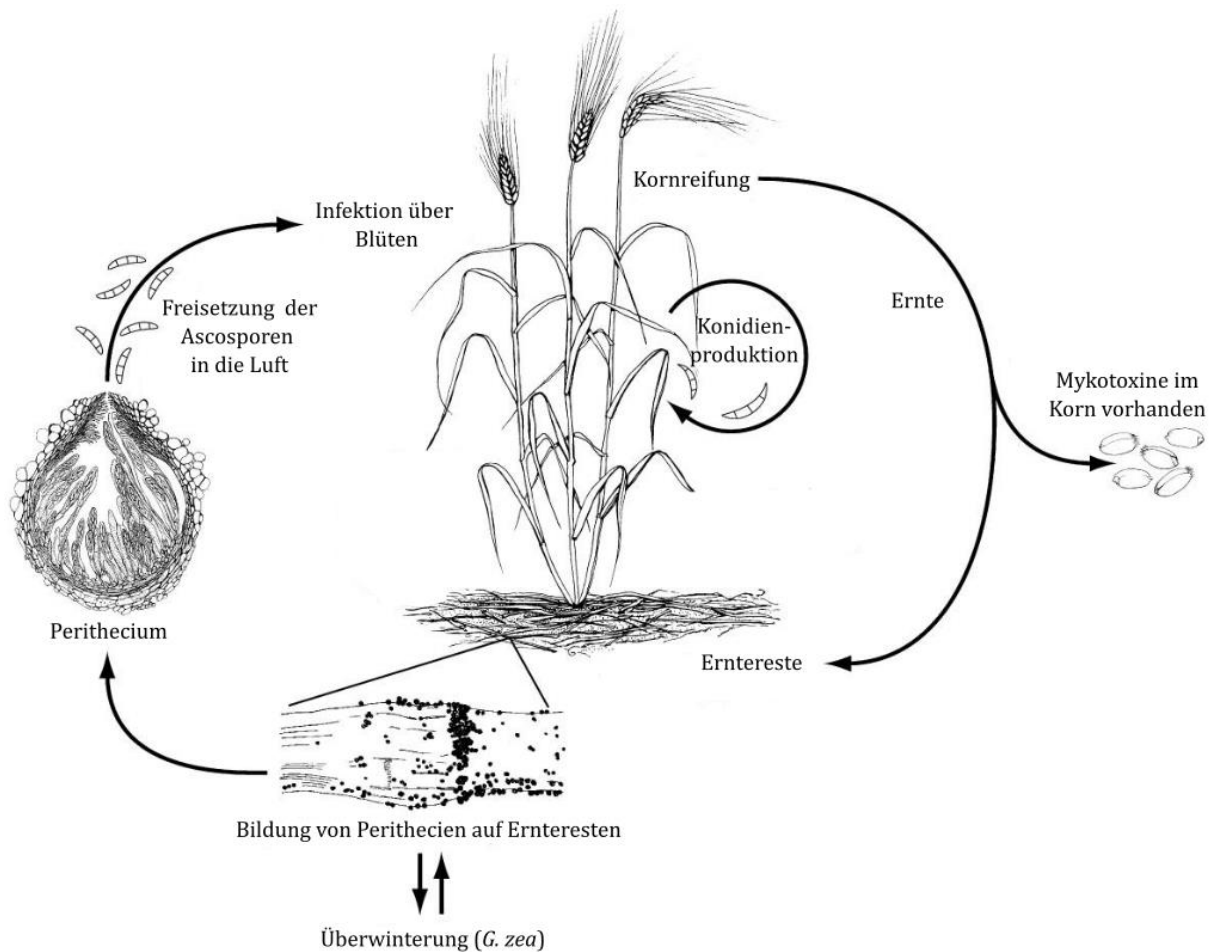


Abbildung 2: Lebenszyklus von *F. graminearum*. Die sexuell gebildeten Ascosporen werden im Frühling aus Perithezien geschleudert und landen auf Blüten von Weizenpflanzen, wo sie auskeimen. Das ausgekeimte Myzel infiziert den Wirt. Auf befallenen Pflanzen werden asexuelle Sporen (Konidien) gebildet, die Sekundärinfektionen auslösen. Mykotoxine befinden sich nach Ernte im Korn. Der Pilz überwintert in Ernteresten auf dem Boden. Abbildung entnommen und modifiziert aus (Trail, 2009).

1.1.2 Bekämpfungsstrategien von FHB Epidemien mittels hypovirulenter Viren

Die Bekämpfung von FHB-Epidemien über die Züchtung resistenter Pflanzen stellt eine sehr ressourcen- und kostenintensive Herausforderung dar, die bis jetzt in nur wenigen registrierten Sorten resultierte (Gilbert & Fernando, 2004; Steiner *et al.*, 2017). Der Einsatz von Fungiziden und die biologische Bekämpfung der Infektion durch den Einsatz von Kupfer- oder Schwefelderivate sind daher wichtige zusätzliche Komponenten, um Ernteverluste zu verringern. Obwohl wirksame Fungizide zugelassen und am Markt verfügbar sind, gestaltet sich ihr Einsatz als schwierig, da eine effiziente Applikation während einer bestimmten frühen Phase der Blüte erfolgen muss. Einzelne Weizenpflanzen im Feld blühen jedoch sehr heterogen zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

EINLEITUNG

Diese Problematik führt dazu, dass die Applikation von Fungiziden grundsätzlich nur in durchschnittlich sieben Tagen pro Vegetationsperiode effizient ist (Alberta Agriculture and Forestry, 2020; Yoshida *et al.*, 2008). Zudem steigt auch das Bewusstsein für die Nebenwirkungen chemischer Pestizide, wie potentiell krebserregende Eigenschaften und deren Rückstände in Grundwasser, Lebens- und Futtermitteln (Jones, 2000). Hinzu kommt, dass der zunehmende und übermäßige Einsatz von Fungiziden zu einer vermehrten Fungizidresistenz in Pilzen führt (Stukenbrock & Gurr, 2023). Daher besteht die Notwendigkeit vermehrt nach ökologisch vertretbaren Alternativen zu suchen.

Eine Alternative zur chemischen Bekämpfung könnten Hypovirulenz-verursachende Mykoviren sein. Mykoviren sind Viren, die in Pilzen replizieren. Sie zeigen im Vergleich zu Viren aus Tieren und Pflanzen einige Unterschiede. Die meisten Mykoviren besitzen, wie auch Pflanzenviren (Joshi & Haenni, 1984) und einige wichtige humanpathogene Viren ein positives einzelsträngiges RNA Genom ((+)ssRNA). Diese Viren replizieren, indem ihr Genom direkt an Ribosomen des Wirts bindet und wie zelluläre mRNA translatiert werden kann. Bekannte Beispiele für (+)ssRNA Mykoviren sind Viren der Familie der *Hypoviridae* und der *Barnaviridae* (Myers & James, 2022). Die zweite wichtige Gruppe sind Mykoviren mit doppelsträngigem RNA Genom (dsRNA). Hier muss das Genom erst mittels der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRP) in Plusstrang-RNA umgeschrieben werden, bevor eine Translation der viralen Proteine erfolgen kann (Ayllón & Vainio, 2023; Jiang *et al.*, 2013).

Die Übertragung von Mykoviren erfolgt in der Regel exklusiv über Sporulation oder Zellfusion (Anastomosen) (Tebbi, 2023). Diese Art der Übertragung resultiert in einer sehr guten Anpassung an den Wirt und die Infektionen verlaufen in der Regel asymptomatisch, doch kommt es in einigen Fällen zu einer erheblichen Schädigung des Wirts. Dieses Phänomen wurde erstmals von Hollings (1962) in Champignon Kulturen beschrieben, wobei die Erntequalität erheblich vermindert wurde und Fruchtkörper abstarben.

Besonderes Interesse wecken Viren, die pathogene Pilze infizieren und deren Virulenz reduzieren (Pearson *et al.*, 2009). Dieser Effekt wird als Hypovirulenz bezeichnet und kann zusätzlich zu reduziertem Myzelwachstum, verminderter sexueller und asexueller Sporulation oder veränderter Pigmentierung führen (Darissa *et al.*, 2012; Ghabrial *et al.*, 2015; Kyrychenko *et al.*, 2018; Nuss, 2005).

Ein gut erforschtes und in der Praxis erfolgreich angewendetes Beispiel ist die Eindämmung des Kastanienrindenkrebse (*chestnut blight*) in Europa durch den Einsatz

EINLEITUNG

des hypovirulenzverursachenden Mykovirus *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) aus der Familie der *Hypoviridae*. Der Kastanienrindenkrebs wird durch den Ascomyzeten *Cryphonectria parasitica* verursacht und schädigt Kastanien in Nordamerika und Europa (Heiniger & Rigling, 1994; Nuss, 1992). Durch Infektion von *C. parasitica* mit CHV1 wird im Pilz eine Hypovirulenz ausgelöst, die zu einer reduzierten Pathogenität und einer reduzierten systemischen Ausbreitung des Pilzes in Kastanienbäumen führt. Zur Bekämpfung des Kastanienrindenkrebses werden auf die Wunden der befallenen Bäume mit CHV1 infizierte Pilzstämme appliziert und so das Virus auf den virulenten Pilzstamm übertragen. In diesem wird so ebenfalls eine Hypovirulenz ausgelöst. Über die Zeit breitet sich das Virus selbstständig im Bestand aus. Die Tumore des Rindenkrebses heilen ab und der befallene Baum wird gerettet (Heiniger, 2007; Nuss, 1992).

Die Bekämpfung von FHB über den Einsatz eines hypovirulenzverursachenden Mykovirus erscheint denkbar und könnte in der Landwirtschaft als ökologisches Fungizid Anwendung finden. Das Mykovirus *Fusarium graminearum* Virus China 9 (FgV-ch9) löst eine Hypovirulenz in *F. graminearum* aus. Mit einer FgV-ch9 Infektion einhergehende Symptome sind hierbei ein reduziertes Pilzwachstum, eine verringerte Produktion von Konidien und eine verminderte Infektiosität auf Weizen. Zudem kommt es zu einer vermehrten Bildung von Aurofusarin (Darissa *et al.*, 2012).

Das virale Genom von FgV-ch9 besteht aus fünf monocistronischen dsRNA Segmenten, die jeweils einzeln in Viruspartikel verpackt sind (**Abbildung 3A**). Innerhalb der Familie der *Chrysoviridae* ist FgV-ch9 im Genus *Betachrysovirus* eingruppiert (Darissa *et al.*, 2011; Lutz *et al.*, 2021). Die Segmente 2 und 3 kodieren für die Strukturproteine (P2 und P3), die wahrscheinlich das Kapsid formen und sind zusammen mit der RdRP, die auf Segment 1 kodiert, Teil des Partikels. Zusätzlich fungiert P3 als Hauptfaktor bei der Induktion der Hypovirulenz und hat einen Einfluss auf die sexuelle und asexuelle Fortpflanzung in *F. graminearum* (Blum, 2017; Bormann *et al.*, 2018). Segment 4 und 5 kodieren für die Nichtstrukturproteine P4 und P5 (Darissa *et al.*, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass P5 eine *gene silencing* Aktivität besitzt, die Funktion von P4 ist bisweilen völlig unbekannt (Blum, 2017).

EINLEITUNG

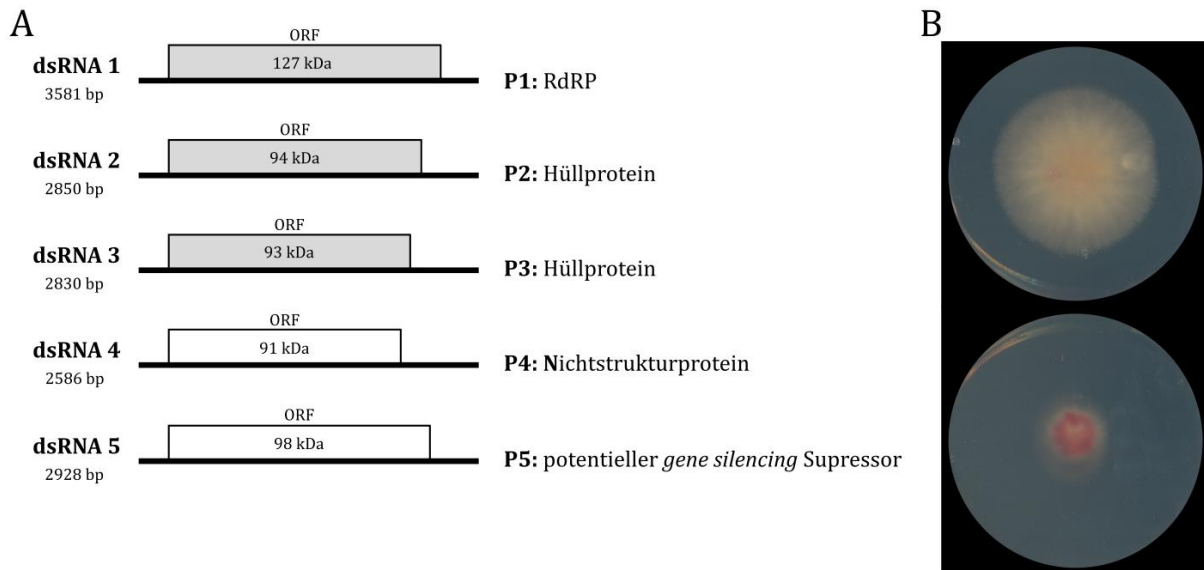


Abbildung 3: Das Chrysovirus *Fusarium graminearum* Virus China 9 (FgV-ch9). (A) Schematische Darstellung der fünf dsRNA Segmente. Die offenen Leseramen (ORFs) sind als Kästen dargestellt. Graue Kästen zeigen Strukturproteine, weiße Kästen zeigen Nichtstrukturproteine. Die Größe der Segmente ist auf der linken Seite dargestellt und das berechnete molekulare Gewicht der Proteine steht in den Kästen der ORFs. Segment 1 kodiert für die RdRP, dsRNA 2 und 3 kodieren für Kapsidproteine, dsRNA 4 kodiert für ein Protein mit unbekannter Funktion und dsRNA 5 kodiert für ein Protein mit *gene silencing* Aktivität. Abbildung modifiziert nach (Darissa *et al.*, 2011). (B) Typischer Phänotyp eines virusfreien (oben) und eines mit FgV-ch9 infizierten (unten) *F. graminearum* auf CM-Festmedium, 3 dpi.

1.2 Übertragung von Mykoviren

Im Gegensatz zu tierischen und pflanzlichen Viren besitzen Mykoviren in der Regel keine extrazelluläre Phase. Allein für das DNA Mykovirus *Sclerotinia sclerotiorum* Hypovirulenz-Assoziiertes DNA-Virus 1 (SsHADV-1) wurde beschrieben, dass Viruspartikel in der Lage waren, intakte Hyphen direkt zu infizieren und eine Hypovirulenz auszulösen (Yu *et al.*, 2013). Zusätzlich konnte das Insekt *Lycoriella ingenua* infiziert und als Vektor genutzt werden (Liu *et al.*, 2016). In der Regel breiten Mykoviren sich jedoch exklusiv vertikal über Sporen und horizontal über Zellfusion aus (Pearson *et al.*, 2009).

Die vertikale Ausbreitung erfolgt über Konidien oder Ascosporen. Nur wenige Studien konnten bisher zeigen, dass auch Ascosporen mit Mykoviren infiziert sein können. (Deng *et al.*, 2003; Ghabrial & Suzuki, 2009; Polashock *et al.*, 1997; Suzaki *et al.*, 2005; Xie & Jiang, 2014). Auch FgV-ch9 konnte nicht in Ascosporen nachgewiesen werden (Blum, 2017).

Die vertikale Ausbreitung findet hauptsächlich in Konidien statt (Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.A). Sobald die Konidiogenese beispielsweise durch die

EINLEITUNG

Bildung von Luftmyzel induziert wird (Morton, 1961), differenzieren sich vegetative Hyphen in bestimmten Regionen des Myzels zu Konidiophoren. An den Spitzen dieser bilden sich Phialiden innerhalb derer sich über Mitose mehrkernige Zellen bilden. Die mehrkernigen Zellen werden durch Zellkompartimentierung geteilt und entwickeln sich zu Konidien (Navarro-Bordonaba & Adams, 1994). Der genaue Mechanismus, wie Viruspartikel in die Konidien gelangen, ist nicht bekannt, doch geht man davon aus, dass sich das Virus in ausreichenden Mengen im Konidiophor akkumulieren muss. Dies ist ein kritischer Moment der vertikalen Transmission, da Viruspartikel oftmals nicht schnell genug in die Hyphenspitzen gelangen, wenn diese wachsen (Eusebio-Cope *et al.*, 2010). Ausgereifte Konidien werden anschließend von den Spitzen der Phialiden ausgestoßen und über die Luft verbreitet (Navarro-Bordonaba & Adams, 1994). Sobald virusinfizierte Konidien in Kontakt mit virusfreien, kompatiblen Nachbarstämmen kommen, können diese eine Infektion über die Bildung von Anastomosen initiieren und das Virus horizontal auf den neuen Stamm übertragen (Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**B**). Über die Bildung von Anastomosen können Pilze miteinander interagieren, genetisches Material austauschen und ein stabiles Netzwerk aus miteinander verzweigten Hyphen – das Myzel – aufbauen. Voraussetzung für die erfolgreiche Hyphenfusion ist die Kompatibilität zwischen zwei Pilzstämmen, da es bei einer vegetativen Inkompatibilität der Pilzhyphen zur Induktion des programmierten Zelltods (PCD) als Verteidigungsmechanismus kommt und so keine Bildung von Anastomosen stattfinden kann (Ghabrial & Suzuki, 2009; Xie & Jiang, 2014). Diese Fusion ist ein komplexer Mechanismus, der aus einem fusionsvermittelndem Kommunikationsschritt und der Fusion selber besteht. Fusionshyphen produzieren, sezernieren und erkennen Signalmoleküle, die das chemotrophe Wachstum beeinflussen. Die chemotrophe Vermittlung der Hyphenfusion erfolgt über die abwechselnde Sekretion von Signalmolekülen und das Erkennen dieser. Das SO Protein ist an der Sekretion von Signalmolekülen während der Vermittlung der Hyphenfusion beteiligt und wird alle vier Minuten für vier Minuten an der Plasmamembran rekrutiert und akkumuliert dort. Anschließend diffundieren die einzelnen SO Moleküle zurück ins Zytoplasma. Das Erkennen der sekretierten Signalmoleküle über noch unbekannte Rezeptoren führt zu einer Rekrutierung des MAK-2 Komplexes an der Plasmamembran der zweiten an der Fusion beteiligten Zelle (Daskalov *et al.*, 2017; Fleissner *et al.*, 2009). Die Rekrutierung von SO und dem MAK-2 Komplex findet hochgradig koordiniert und in exakter Antiphase zwischen den beiden Hyphenspitzen statt (Fischer & Glass, 2019;

EINLEITUNG

Fleißner & Herzog, 2016; Haj Hammadeh *et al.*, 2022). Sobald die interagierenden Hyphen physischen Kontakt haben, beginnen sie mit dem Prozess der Zellfusion, der den Abbau der Zellwand, den Umbau der Plasmamembranen und schließlich die Verschmelzung des Zytoplasmas beinhaltet. Nach Fusion der beiden Zellen wird die Zellwand um den Ort der Fusion wieder hergestellt (Goryachev *et al.*, 2012; Hickey *et al.*, 2002; Maruthachalam & van den Berg, 2015).

Mykoviren sind in der Regel im Zytoplasma zu finden und können bei Austausch desselben nach erfolgreicher Bildung von Anastomosen von einem Individuum auf das nächste übertragen werden.

Innerhalb des Myzels breiten sich Mykoviren ebenfalls über Anastomosen oder von Zelle zu Zelle aus (Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.C). Die einzelnen Kompartimente sind durch Septen voneinander abgegrenzt, die aber so große Poren aufweisen, dass nicht nur kleine Moleküle, sondern auch Organellen die Kompartimente wechseln können (Buller, 1909; Jedd, 2011). Eine solche Zell-zu-Zell Verbindung ähnelt damit nicht Gap Junctions in tierischen Zellen und Plasmodesmen in pflanzlichen Zellen, mit deren Hilfe zwar auch interzelluläre Kommunikation sowie der Transport und Austausch von Nährstoffen, Molekülen, Organellen und Viruspartikeln möglich ist, bei denen aber das *size exclusion Limit* (SEL) bei wenigen Kilodalton liegt (Xu *et al.*, 2012). Durch das Vorhandensein von so großen Poren in den Septen kann es nach mechanischer Beschädigung einer Hyphe zu unkontrolliert aus dem Netzwerk ausströmendem Zytoplasma und damit zu einer Bedrohung des Hyphennetzwerkes kommen (Jedd & Chua, 2000; Lew, 2005; Lichius *et al.*, 2012). Um das unkontrollierte Ausströmen von Zytoplasma zu verhindern, gibt es einen Mechanismus, durch den die septalen Poren als Reaktion auf Hyphenschäden schnell verschlossen werden können. Dieser Verschluss basiert bei filamentösen Ascomyzeten wie *F. graminearum* auf spezialisierten Organellen – den *Woronin bodies* – (Markham & Collinge, 1987). Diese bestehen hauptsächlich aus dem Protein Hex-1, welches in Peroxisomen mit Hilfe des *Woronin body sorting complex* (WSC) an die Matrixseite der Peroxisomen rekrutiert, dort zu *Woronin bodies* zusammengesetzt und dann an die septalen Poren transportiert wird, wo sie über Leashin (LAH) Proteine an den Septen verankert werden (Jedd & Chua, 2000; Liu *et al.*, 2008; Ng *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2003).

Auch das bereits erwähnte, an der Hyphenfusion beteiligte SO Protein ist ein weiteres am Verschluss von septalen Poren beteiligtes Protein, was weniger bekannt ist. Unter normalen Wachstumsbedingungen ist es im Zytoplasma verteilt, doch unter

EINLEITUNG

Stressbedingungen wie Hyphenverletzungen, Temperaturstress oder Stickstoffmangel aggregiert SO in *Neurospora crassa*, *Sordaria macrospora* und *Aspergillus oryzae* an septalen Poren (Fleissner & Glass, 2007; Maruyama *et al.*, 2010). Zusätzlich spielen SO und seine Homologe eine wichtige Rolle bei der sexuellen Entwicklung, der Ascosporenbildung und SO ist als Gerüstprotein am *Cell Wall Integrity* (CWI) Signalweg beteiligt, der eine wichtige Rolle in der Bildung von Appressorien bei *Colletotrichum gloeosporioides* spielt (Engh *et al.*, 2007; Fang *et al.*, 2018; Fleissner *et al.*, 2009; Fleissner & Glass, 2007). Bis jetzt sind keine Studien oder Daten bekannt, die zeigen, dass SO in *F. graminearum* ähnliche Funktionen wie in den oben erwähnten Ascomyzeten *N. crassa*, *S. macrospora*, *A. oryzae* und *C. gloeosporioides* ausübt. Über das Verhalten von SO und seinen Homologen bei einer Virusinfektion ist bisher nichts bekannt.

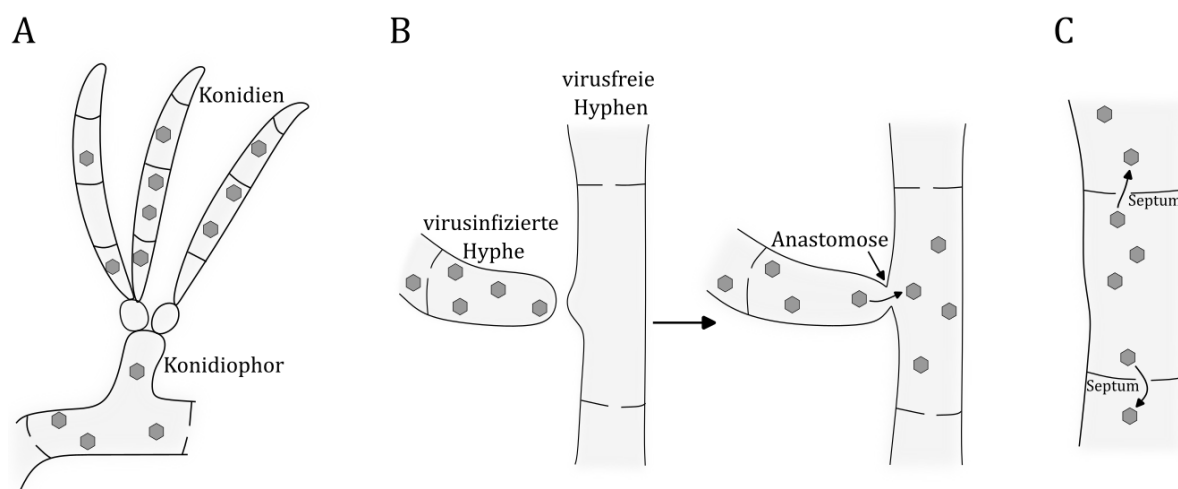


Abbildung 4: Übertragungswege von Mykoviren. (A) Vertikale Ausbreitung über Konidien. (B) Horizontale Ausbreitung aus infizierten Pilzhyphen über Anastomosen in uninfizierte Hyphen. (C) Zell-zu-Zell Ausbreitung über septale Poren innerhalb des Pilzmyzels. Abbildung modifiziert nach (Nuss, 2005; Ohara *et al.*, 2004).

1.3 FgV-ch9 als Biozid zur Eindämmung von FHB-Epidemien

Die Bekämpfung von FHB-Epidemien durch die Applikation FgV-ch9 infizierter *F. graminearum* Stämme auf Weizenfelder könnte analog zur Bekämpfung des Kastanienrindenkrebses durch CHV1 infizierte Pilzstämmen zu einer Eindämmung der Krankheit führen. Jedoch erweist sich die Applikation des FgV-ch9/*F. graminearum* Systems als schwieriger, da Weizen-Arten einjährige Gräser sind und eine Applikation dem entsprechend jährlich erfolgen muss. Auch die Art der Applikation muss sich unterscheiden. Obwohl der Einsatz von bereits ausgekeimtem Pilzmyzel möglich erscheint, ist dieses gegenüber äußeren Umwelteinflüssen wie Trockenheit empfindlich

EINLEITUNG

und stirbt schnell ab. Eine bessere Alternative ist die Applikation über virusinfizierte Konidien, da diese als Dauerorgane in der Sporenform verbleiben, bis die Umweltbedingungen günstig sind. Sie keimen zeitgleich mit natürlich auf dem Feld vorhandenen virulenten *Fusarium* Stämmen aus und anschließend können Mykoviren auf die virulenten Pilzstämmen übertragen werden.

Allgemein scheitert das Ausbringen virusinfizierter Konidien als Biozid bisher daran, dass die Konidien nur zu einem geringen Anteil zu hypovirulentem Myzel auskeimen (Hillman & Suzuki, 2004; Lee *et al.*, 2014). Für *F. graminearum* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass aus nur ca. 30% der Konidien zu hypovirulentem Myzel auszukeimen (C. Heinze, Universität Hamburg, nicht publiziert). Eine geringe Übertragungsrate von 30% stellt insofern ein Problem dar, da bei einer Applikation dieser Konidien als Biozid die Wahrscheinlichkeit besteht, durch die hohe Anzahl an Konidien, die nicht in hypovirulentes Myzel auszukeimen, eine FHB-Epidemie auszulösen, anstatt diese einzudämmen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Eine Bekämpfung von FHB mit der Ausnutzung der Hypovirulenz ist grundsätzlich möglich und wäre aufgrund von wirtschaftlichen und ökologischen Aspekten ein Fortschritt. Eine Applikation des hypovirulenzverursachenden Virus FgV-ch9 im Feld könnte über ein Ausbringen von virusinfizierten Konidien erfolgen. Eine Voraussetzung dafür ist die stabile und effiziente Übertragung des FgV-ch9 in Konidien, die im natürlichen Wirt/Pathogensystem zu gering ist.

In dieser Arbeit sollte die Übertragungseffizienz in Konidien untersucht und erhöht werden. Neben dem Einfluss des Virustiters wurden zwei Proteine identifiziert und charakterisiert, die am Verschluss septaler Poren beteiligt sind und an der Übertragung der Viren beteiligt sein könnten. (i) Das Hex-1 Protein, welches zusätzlich in *Fusarium graminearum* Virus 1 (FgV1) Infektionen als Wirtsfaktor fungiert, dadurch die Akkumulation viraler RNA begünstigt und somit ein vielversprechender Kandidat zur Analyse der Virusausbreitung darstellt. (ii) Das SO Protein ist neben der Aggregation an septalen Poren ein essentieller Bestandteil in der Formierung von Anastomosen, weshalb auch dieses Protein ein sehr interessanter Kandidat zur Untersuchung der Virusausbreitung ist.

Eine Deletion, oder womöglich auch Überexpression dieser Proteine, könnte demnach zu einem verbesserten Transport von Virus in die Konidien führen. Die damit einhergehende

EINLEITUNG

Veränderung des pilzlichen Genoms darf für einen Einsatz in der Praxis aber wiederum nicht dazu führen, dass kaum oder keine Konidien mehr produziert werden können oder die Pilze in Ihrer Infektiosität erhöht sind. Daher wurde auch die Pathogenität aller virusinfizierten Mutanten auf ihren natürlichen Wirt - *Triticum aestivum* – untersucht.

2. Material

2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen:

Analytik Jena (Jena, Deutschland)
Avegene (Taipeh, Taiwan)
Duchefa (Haarlem, Niederlande)
Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
GeneAid Biotech (New Taipei City, Taiwan)
Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Merck (Darmstadt, Deutschland)
New England Biolab (Frankfurt am Main, Deutschland)
peqLab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)
Promega (Mannheim, Deutschland)
Roche (Grenzach-Wyhlen, Deutschland)
Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Serva (Heidelberg, Deutschland)
Sigma (München, Deutschland)
Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Solis Bio Dyne (Tartu, Estland)
Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Th. Geyer (Renningen, Deutschland)

Die Chemikalien entsprachen, wenn nicht anders erwähnt, dem Reinheitsgrad *pro analysis*. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Medien und Lösungen mit Reinstwasser (PureLab Flex, ELGA LabWater, Celle) hergestellt. Die Versuche wurden, falls nicht anders beschrieben, mit autoklaviertem doppelt destilliertem Wasser (*ddH₂O*) durchgeführt.

2.2 Organismen

2.2.1 Bakterienstämme

Zur Erstellung von Konstrukten (2.6) wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen, USA) genutzt.

MATERIAL

2.2.2 *Fusarium graminearum*-Stämme

Für die Herstellung und Charakterisierung der Mutanten (3.5) wurde der *Fusarium graminearum* Wildtypstamm FgPH1 DK (FgPH1, strain passport: NRRL 31084) verwendet. Als Donor-Stamm für die Infektion von *Fusarium*-Stämmen mit dem Virus FgV-ch9 (Darissa *et al.*, 2011) dienten virusinfizierte FgPH1 Stämme (Bormann *et al.*, 2018) oder der Stamm FgCh9 (Darissa *et al.*, 2011).

2.2.3 Pflanzen

Für alle Untersuchungen der Virulenz von *F. graminearum* auf Wirtspflanzen wurde das Weizenkultivar *Triticum aestivum* cv. Nandu (KWS Lochow-Petkus, Bergen, Deutschland) verwendet. Die Pflanzen wurden in einer Klimakammer über ca. 6-8 Wochen bei 18-20°C mit 60% relativer Luftfeuchtigkeit und 16 Tageslichtstunden angezogen.

2.3 Medien

Die einzelnen Bestandteile der Medien wurden in *ddH₂O* gelöst und bei 121°C und 2 bar für ca. 20 Minuten autoklaviert. Temperaturempfindliche Substanzen, wie Antibiotika wurden in das handwarme Medium gegeben. Zucker wurden bei geringeren Konzentrationen mitautoklaviert und ansonsten über einen 0.2 µm Filter steril filtriert. Weizenmedium wurde nach dem Autoklavieren über einen Papierfilter (Grade MN 6151/4, Macherey-Nagel, Deutschland) filtriert und anschließend nochmals autoklaviert.

LB-Medium	10 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl
	ad 1 L	<i>ddH₂O</i>

Für Festmedium + 1.5% (w/v) Mikroagar

LB-Amp	150 mg	Ampicillin
	ad 1 L	LB-Medium

LB-Kan	50 mg	Kanamycin
	ad 1 L	LB-Medium

SOB-Medium	20 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	500 mg	NaCl
	200 mg	KCl

MATERIAL

ad 1 L *ddH*₂O

Weizen-Medium

5 g Weizen gras (Feinstoff Superfood Bio
Weizen gras, Pulver)

ad 1 L *ddH*₂O

CM-Medium

1 g Hefeextrakt
500 mg Casein (enzymatisch verdaut)
500 mg Casein (säurehydrolysiert)
10 ml CM-Lösung A
10 ml CM-Lösung B
50 ml CM-Lösung C
1 ml CM-Lösung D

Für Festmedium + 1.6% (w/v) Mikroagar

CM-Lösung A

100 g Ca(NO₃)₂×4H₂O
ad 1 L *ddH*₂O

CM-Lösung B

20 g KH₂PO₄
25 g MgSO₄×7H₂O
10 g NaCl

CM-Lösung C

200 g Glukose
ad 1 L *ddH*₂O

CM-Lösung D

60 g H₃BO₃
390 mg CuSO₄×5H₂O
13 mg KI
60 mg MnO₄×H₂O
51 mg (NH₄)₆MO₇O₂₄×4H₂O
5.48 mg ZnSO₄×7H₂O
932 mg FeCl₃×6H₂O
2 ml Chloroform
ad 1 L *ddH*₂O

CM-Lösung D ohne Kupfer

60 g H₃BO₃
13 mg KI
60 mg MnO₄×H₂O
51 mg (NH₄)₆MO₇O₂₄×4H₂O
5.48 mg ZnSO₄×7H₂O
932 mg FeCl₃×6H₂O
2 ml Chloroform

MATERIAL

	ad 1 L	<i>ddH</i> ₂ O
CM-Gen	100 mg	Geneticin
	ad 1 L	<i>ddH</i> ₂ O
CM-Hyg	250 mg	Hygromycin B
	ad 1 L	<i>ddH</i> ₂ O
CM-NAT	100 mg	Nourseothricin
	ad 1 L	<i>ddH</i> ₂ O
CM-Induktionsmedium	1 g	Hefeextrakt
	500 mg	Casein (enzymatisch verdaut)
	500 mg	Casein (säurehydrolysiert)
	10 ml	CM-Lösung A
	10 ml	CM-Lösung B
	50 ml	CM-Lösung C
	1 ml	CM-Lösung D ohne Kupfer
	78 mg	Bathocuproindisulfonsäure-Dinatriumsalz
	Für Festmedium	+ 1.6% (w/v) Mikroagar
Minimalmedium	10 ml	CM-Lösung A
	10 ml	CM-Lösung B
	50 ml	CM-Lösung C
	1 ml	CM-Lösung D
	Für Festmedium	+ 1.6% (w/v) Mikroagar
Minimalmedium ohne Kupfer	10 ml	CM-Lösung A
	10 ml	CM-Lösung B
	50 ml	CM-Lösung C
	1 ml	CM-Lösung D ohne Kupfer
	78 mg	Bathocuproindisulfonsäure-Dinatriumsalz
	Für Festmedium	+ 1.6% (w/v) Mikroagar
SNA-Festmedium	1 g	KH ₂ PO ₄
	1 g	KNO ₃
	0.5 g	MnSO ₄ ×7 H ₂ O
	0.5 g	KCl
	0.2 g	Glukose

MATERIAL

0.2 g Saccharose
16 g Mikroagar
ad 1 L ddH₂O

YEPD-Medium

3.0 g Hefeextrakt
10 g Pepton
20 g Glukose
ad 1 L ddH₂O

Für Festmedium + 1.5% (w/v) Mikroagar

TB3-Medium

200 g Saccharose
3 g Hefeextrakt
3 g Casein (säurehydrolysiert)
ad 1 L ddH₂O

Für Festmedium + 1.5% Mikroagar

H₂O-Festmedium

15 g Mikroagar
ad 1 L ddH₂O

Karotten-Medium

400 g Karotten
(gekocht 10 Minuten in 400 mL ddH₂O)
20 g Mikroagar
ad 500 mL ddH₂O

Für Festmedium + 1.5% (w/v) Mikroagar

2.4 Antiseren

Die zur spezifischen Detektion von Proteinen im ELISA verwendeten Antiseren sind in **Tabelle 1** dargestellt.

Tabelle 1: Liste der verwendeten Antiseren.

Bezeichnung Antigen		Spezies	Hersteller
AS0115	Partikel des Virus FgV-ch9	Kaninchen	Dr. F. Rabenstein (Julius-Kühn-Institut, Quedlinburg, Deutschland) (Darissa <i>et al.</i> , 2011)
A3587	Anti-Rabbit IgG	Ziege	Sigma-Aldrich, USA

2.5 Synthetische Oligonukleotide (Primer)

Die verwendeten synthetischen Oligonukleotide (Primer) für alle Klonierungen wurden von der Firma Eurofins Genomics Deutschland hergestellt und sind in **Tabelle 2** dargestellt. Restriktionserkennungsschnittstellen sind Fett dargestellt. Die Sequenz des GS-Linkers ist unterstrichen.

Tabelle 2: Liste der verwendeten Klonierungsprimer.

Interne Nummerierung	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
1	PgpdA F	GCA GGC GCG CCG AAT TCC CTT GTA TCT CTA CAC ACA G
2	PgpdA R	GCA CCC GGG AAA AGA AAG AGA AAA GAA AAG AGC AG
3	pJET F	CGA CTC ACT ATA GGG AGA GCG GC
4	PKS12 LF F	GCA GCG GCC GCT GAA GAA TTT GAG GCA GCC G
5	PKS12 LF R	GCA GGC GCG CCA TCC TAC CCA GCA CTT CG
6	PKS12 RF F	GCA TCT AGA ATC CGT CCT CGA AAA GTT C
7	PKS12 RF R	GCA ATC GAT AGT TGA GTC GAC CAG GAG
8	pJET R2	CTT GAG AGA ATA AAA GAA GAA CAT CG
9	NptII F	GCA CCC GGG ATG ATT GAA CAA GAT GGA TTG CAC
10	NptII R	GCA TCT AGA TCA GAA GAA CTC GTC AAG AAG G
11	PKS12 intern F	GAA TTG CTT ACC ATT TCA ATG ATG AAT G
12	PKS12 intern R	GAT ATC ATC CTT GCC GGC AG
13	M13 F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT
14	M13 R	CAG GAA ACA GCT ATG ACC
15	HygB F	GAA TTC AGC GAG AGC CTG AC
16	HygB R	GAT GTT GGC GAC CTC GTA TT
17	Hex1 F	ATG GGG GTG AGA TAT GGC AGT AA
18	Hex1 R	CTC GAG TTA CAG GCG AGA GCC GTG GA
19	Hex1 LF F	GAG CTG AAG CAG CTG GTC
20	Hex1 LF R	GAA GCT TCG ATC TCG TCA CC
21	Poleg F	GCC GCA TTC CCG ATT CG

MATERIAL

Interne Nummerierung	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
22	NatR R	GCA TCT AGA AAG ATT CAG GGG CAG GGC ATG C
23	Poleg R	ATG GAT CCA TTG TGA TGT GAT GG
24	FGSG_13060 up F	GCA GCG GCC GCT ACT TCT TAG ACT ACC TAT TTT TAT ACC
25	FGSG_13060 up R	GCA CTC GAG CAT ACG TAA ATA GGA GGA ATG G
26	FGSG_13060 down F	GCA TCT AGA GAT CGC GAC GGA AAT GTA CC
27	FGSG_13060 down R	GCA ATC GAT AAC GAA TGC GAC GTA GTT ACG TC
28	NatR F	ATG ACC ACT CTT GAC GAC ACG
29	SO sequencing F	CTG AAC AAC AGC CCAC AAC AGA AG
30	SO sequencing R	GTT CAG ACC GGC AGT CAG G
31	eGFP_F	CTC GAG ATG GTG AGC AAG GGC GAG GA
32	eGFP_GS-Linker R	GGA TCC TCC ACC TCC CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC GTG
33	GFP-tr. Hex1 F	GGA GGT GGA GGA TCC GGT TAC GAC GAC GAG
34	1778	CTG CTG TTC TCC TAT CAA ACT CGG
35	1573	GGC AGC AGC ACG GGG CCG TCG
36	FGSG_13060 F	TTA ATT AAA TGG AGC GCA GCC GTG
37	FGSG_13060 R	GGA TCC TCC ACC TCC TCG GCC ATA TTC CAA ATG AGG G
38	mCherry F	GGA GGT GGA GGA TCC GTG AGC AAG GGC GAG G
39	mCherry R	GCA TCT AGA TTA CTT GTA CAG CTC GTC C
40	pJET R	AAG AAC ATC GAT TTT CCA TGG CAG
41	1 kb up stop SO F	CCG GTC TGA ACG GAC CC
42	1 kb up stop SO R	TCG GCC ATA TTC CAA ATG AGG
43	GS-mCherry/SO up 15 AS F	GTC ATC ATC CCT CAT TTG GAA TAT GGC CGA GGA GGT GGA GGA TCC GTG
44	mCherry/HygB 15 AS R	GTC AAG TGG TAC ACT AGT CTA GAT TAC TTG TAC AGC TCG TC
45	HygB/mCherry 15 AS F	GAC GAG CTG TAC AAG TAA TCT AGA CTA GTG TAC CAC TTG AC
46	HygR/SO down 15 AS R	AGT ATC CGG TTT TCA AAT ATA TGA ACG ACA CTA TTC CTT TGC CCT CGG AC

MATERIAL

Interne Nummerierung	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
47	1 kb down stop SO F	TGT CGT TCA TAT ATT TGA AAA CCG GAT AC
48	1 kb down stop SO R	GTT CCG ACT TCG CCA AGC

Die verwendeten synthetischen Oligonukleotide (Primer) für die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) wurden von der Firma Eurofins Genomics Deutschland hergestellt und sind in **Tabelle 3** dargestellt.

Tabelle 3: Liste der verwendeten qRT-PCR Primer

Interne Nummerierung	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
49	β -Tubulin F	TGT CGA CGA CCA GTT CTC AGC
50	β -Tubulin R	CGA TGT CGG CGT CTT GGT AT
51	SO_1 F	CTG AAC AAC AGC CCAC AAC AGA AG
52	SO_1 R	CTT GAT CCA GCT TGC TGA GG
53	Hex-1_1 F	GCA ACA CAA CAA ACC GTT AC
54	Hex-1_1 R	TCA CGC GTA ATA TGG ACC TC

2.6 Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in **Tabelle 4** dargestellt.

Tabelle 4: Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide mit Funktion und Quelle

Bezeichnung	Funktion	Quelle
pAN7.1	Überexpressionsvektor mit TrpC Promoter	Mullaney <i>et al.</i> (1985)
pJET	pJET1.2/Blunt	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
pII99GFP	Überexpressionsvektor mit TrpC Promoter, Geneticin Resistenz und eGFP	Namiki <i>et al.</i> (2001)
pRS246_elf5A-ko	pGEM-T Vektor beinhaltet das hex-1 Knockout-Konstrukt	A. L. Martínez Rocha nicht publiziert, Universität Hamburg (Anhang 2A)
pSilent-1 NAT	Überexpressionsvektor mit Nourseothricin Resistenzkassette und TrpC Promoter	C. Heinze nicht publiziert, Universität Hamburg (Anhang 2B)
pGEM-T	pGEM®-T Vektorsysteme	Promega, Madison, Wisconsin, USA

MATERIAL

Bezeichnung	Funktion	Quelle
pGEM-T HygB	pGEM-T Vektor mit HygromycinB Resistenzkassette	C. Heinze nicht publiziert, Universität Hamburg (Anhang 2C)
pBJ-1	Überexpressionsvektor mit kupferinduzierbarem Promoter und mCherry	Bormann <i>et al.</i> (2018)

2.7 Software und Datenbanken

Im Folgenden sind alle in dieser Arbeit verwendeten Programme und Datenbanken aufgeführt:

SnapGene (GSL Biotech LLC)

RStudio (Posit PBC)

Microsoft Office (Excel, Word, Power Point; Microsoft Corporation)

Origin 2021b (OriginLab Corporation)

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; NCBI)

Inkscape 1.3 (GPL)

ExPASy Translate tool (Swiss Institute of Bioinformatics)

ExPASy ProtParam tool (Swiss Institute of Bioinformatics)

GeneBank® (International Nucleotide Sequence Database Collaboration)

MycCosm (Joint Genome Institute)

3. Methoden

3.1 Anzucht von *Fusarium graminearum*

3.1.1 Anzucht von Myzel auf Festmedium

Zur Anzucht von Myzel auf Festmedium (2.3) wurden entweder 5 µl Konidien (3.1.4) auf frisches Festmedium pipettiert oder 2.5 mm² von auf Festmedium gewachsenem Myzel ausgeschnitten und auf frisches Festmedium umgesetzt.

Zudem wurde Myzel - geerntet von Festmedium - auf Cellophan-CM- (C_{CM}) und Cellophan Induktionsmedium-Platten (C_{ICM}) angezogen (Roth, Deutschland). Hierfür wurde Cellophan mit 200 µl *ddH*₂O befeuchtet, auf eine CM-Platte oder CM-Induktions-Platte gelegt und mit Spatel faltenfrei und steril ausgestrichen. Anschließend wurde mit einem Korkbohrer (2.5 mm²) ausgestochenes Myzel auf die Cellophan-Platten umgesetzt.

Die Platten wurden für 3-7 Tage bei 28°C im Dunkeln inkubiert.

3.1.2 Anzucht von Myzel in Flüssigmedium

Zur Anzucht von Myzel in Flüssigkultur wurde ca. 3mm² von auf Festmedium gewachsenem Myzel (3.1.1) ausgeschnitten und in 10-50 mL CM-Flüssigmedium (2.3) in einen 100 mL Erlenmeyerkolben überführt. Anschließend wurden die Kolben für ca. 3 Tage bei 28°C und 150 rpm im Dunkeln inkubiert.

3.1.3 Anzucht von Konidien auf Festmedium

Zur Produktion von Konidien auf Festmedium wurde ca. 3 mm² von auf Festmedium gewachsenem Myzel (3.1.1) ausgeschnitten und auf SNA-Medienplatten umgesetzt. Die Inkubation erfolgte für 7 Tage bei 22°C unter UV-Licht in einem Klimaschrank. (SANYO Versatile Environmental Test Chamber MLR-350, SANYO, Japan). Anschließend wurde die Platte 2× mit 2 mL sterilem *ddH*₂O abgeschwemmt, über ein Wilson-Sieb (Greiner, Österreich, 200 mesh) filtriert und mit der gleichen Menge an sterilem *ddH*₂O gewaschen. Die Konidienmischung wurde anschließend für 3 Minuten bei 2000 rpm (LMC-4200R, Biosan, Riga, Lettland) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Konidien in 1 mL sterilem *ddH*₂O aufgenommen. Mittels einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer wurde die Konidienzahl pro µl bestimmt.

METHODEN

3.1.4 Anzucht von Konidien auf Flüssigmedium

Zur Produktion von Konidien in Flüssigkultur wurde mit einem Korkbohrer (\varnothing 6 mm) auf Festmedium gewachsenes Myzel (3.1.1) ausgestanzt und in 10-50 mL Weizenmedium (2.3) in einem 100 mL Erlenmeyerkolben überführt. Die Inkubation erfolgte für 3 Tage bei 28°C und 150 rpm im Dunkeln. Anschließend wurde die Kultur über ein Wilson-Sieb (Greiner, Österreich, 200 mesh) filtriert und mit der gleichen Menge an sterilem *ddH*₂O gewaschen. Der Überstand wurde anschließend für 3 Minuten bei 2000 rpm (LMC-4200R, Biosan, Riga, Lettland) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Konidien in 1-15 mL sterilem *ddH*₂O aufgenommen. Mittels einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer wurde die Konidienzahl pro μ l bestimmt und auf 1000 Konidien/ μ l eingestellt.

3.2 Extraktion von FgV-ch9 Polysomen

2x Extraktionspuffer	200 mM	Tris-HCl
	400 mM	KCl
	35 mM	MgCl ₂
	80 mM	Sucrose
Extraktionspuffer	50% (v/v)	2x Extraktionspuffer
pH 9.0	1% (w/v)	Triton-X-100
	0.05% (w/v)	B-Mercaptoethanol
Sucroselösung	40 mM	Tris-HCl
pH 8.5	200 mM	KCl
	35 mM	MgCl ₂
	140 mM	Sucrose

Für die Extraktion von Polysomen und unprozessierten viralen Proteinen aus virusinfiziertem Myzel wurde ein modifiziertes Protokoll nach (Jackson & Larkins, 1976) verwendet.

Für die Extraktion wurden ca. 2.5 g in Flüssigkultur gewachsenes virusinfiziertes Myzel (3.1.2) geerntet und unter flüssigem Stickstoff gemörsert. Das gemörserte Myzel wurde anschließend mit 25 ml Extraktionspuffer vermischt und bei 4100 rpm für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert (LMC-4200R, Biosan, Riga, Lettland). Der Überstand wurde auf 5 ml Sucroselösung in einem SW28-Zentrifugenröhrchen überschichtet und für 1 Stunde und 42 Minuten bei 28000 rpm zentrifugiert (Optima™ LE-80K, SW28, Beckman Coulter, Indianapolis, USA). Die obere Phase wurde bis zum Sucrosekissen abgesaugt und verworfen. Um mögliche Verunreinigungen zu entfernen wurden die Wände des

METHODEN

Zentrifugenröhrchens mit *ddH₂O* gespült, welches ebenfalls abgesaugt wurde. Anschließend wurde das Sucrosekissen abgesaugt und verworfen. Das Pellet wurde anschließend mit einem Glasstab zerstoßen und in 100-200 µl TE Puffer (3.4.4) aufgenommen und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Reaktionsgefäß wurde bei 8000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend aliquotiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch (NanoDrop™ One Mikrovolumen-UV/VIS-Spektralphotometer, Thermo Fisher Scientific, USA).

3.3 Infektion von *Fusarium graminearum* mit dem Virus FgV-ch9

3.3.1 Infektion über Ko-Kultivierung

Die Infektion von Pilztransformanten mit dem Virus FgV-ch9 mittels Ko-Kultivierung erfolgte über bereits infiziertes Pilzmyzel. Hierbei wurde mit einem Korkbohrer (Ø 6 mm) auf Festmedium (3.1.1) gewachsenes virusinfiziertes Myzel (Donor) ausgestanzt und auf CM-Medienplatten (2.3) umgesetzt. Nach der Inkubationszeit von 1-2 Tagen bei 28°C im Dunkeln wurden mittels eines Korkbohrers (Ø 6 mm) zweimal Myzel der zu infizierenden Transformante (Akzeptor) ausgestanzt und in 1 cm bzw. 2 cm Entfernung zum Donor auf die CM-Medienplatte umgesetzt. Nach ca. 3 Tagen Inkubation bei 28°C im Dunkeln wurde Myzel an den Überschneidungsbereichen zwischen Donor-Myzel und Akzeptor-Myzel ausgeschnitten und auf Akzeptor-spezifische Selektionsplatten umgesetzt und Flüssigkulturen hergestellt. Der Nachweis der Virusinfektion erfolgte mittels RNA-Extraktion aus Myzel (3.5.5).

3.3.2 Infektion über Kondienmischung

Die Infektion von Pilztransformanten mit dem Virus FgV-ch9 kann ebenfalls über die Mischung von Konidien und frisch ausgekeimten Pilzmyzel erfolgen. Hierbei wurden Konidien (3.1.4) der zu infizierenden Transformante mit Konidien des natürlicherweise infizierten FgCh9-Stammes 1:1 und 1:9 gemischt. Anschließend erfolgte eine Verdünnung der Konidienmischungen von 500 Konidien/µl bis 10 Konidien/µl. Es wurden jeweils 5 µl der Verdünnungen auf CM-Platten (2.3) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte für 1-3 Tage bei 28°C im Dunkeln. Potentiell virusinfiziertes Myzel wurde ausgeschnitten und auf Akzeptor-spezifische Selektionsplatten (2.3) umgesetzt und Flüssigkulturen hergestellt. Der Nachweis der Virusinfektion erfolgte mittels RNA-Extraktion aus Myzel (3.5.5).

3.4 Klonierungsmethoden

3.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion ist es möglich, bestimmte DNA-Sequenzen zu amplifizieren. Für die Amplifikation mittels kurzer Oligonukleotide (2.5) wurden verschiedene Polymerasen verwendet. Zur Klonierung und Herstellung von Transformations-Inserts wurde die Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, USA) oder die Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, Deutschland) genutzt.

Für die Fusion von zwei PCR Produkten wurde die *overlap extension* PCR mit Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, USA) genutzt. Hierzu wurden im ersten Schritt PCR-Produkte mit spezifischen Primern amplifiziert, sodass eine Sequenzüberlappung von ca. 30 Basenpaaren entstand. In einer anschließenden PCR wurden die außenstehenden Primer der beiden vorangegangenen Amplifikationen genutzt, sodass ein Fusionsamplifikat entstand.

Zur Überprüfung transformierter Klone wurden Kolonie-PCRs durchgeführt. Es wurde die DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, USA) verwendet. Die auf Selektionsplatten gewachsenen Klone wurden in 20 µl *ddH2O* aufgenommen. Hiervon wurde 1 µl als Template eingesetzt. Die Ansätze der verschiedenen Polymerase-Reaktionen sind in **Tabelle 5** dargestellt.

Tabelle 5: Herstellungsschema der verschiedenen PCR-Ansätze.

	Reagenz	Volumen [µl]
Phusion® DNA Polymerase	5× GC-Puffer	10
	2mM dNTP-Mix	5
	DMSO	1.5
	10 µM Primer F	2.5
	10 µM Primer R	2.5
	1 U Phusion® DNA Polymerase	0.5
	Template	2
	<i>ddH2O</i>	26
Q5® DNA Polymerase	2× Q5 Master-Mix	25
	10 µM Primer F	2.5
	10 µM Primer R	2.5
	Template	2
	<i>ddH2O</i>	18
DreamTaq DNA Polymerase	10× DreamTag Green-Buffer	1
	2mM dNTP-Mix	1

METHODEN

	Reagenz	Volumen [μ l]
	10 μ M Primer F	0.5
	10 μ M Primer R	0.5
	1 U DreamTaq Polymerase	0.1
	Template	1
	ddH ₂ O	5.9

Die Amplifikationen erfolgten in verschiedenen Thermocyclern. Die genutzten Programme sind in **Tabelle 6** dargestellt.

Tabelle 6: Thermocycler-Programme für verschiedene PCR-Ansätze.

Schritt	Temperatur [°C]		Zeit [min]		Phase
	Phusion/ Q5	DreamTaq	Phusion/ Q5	DreamTaq	
1	99	99			Deckel erhitzen
2	98	95	0:30	5:00	Initiale Denaturierung
3	98	95	0:10	0:30	Denaturierung \uparrow
4	60-72	50-65	0:10	0:30	Annealing $\times 30$
5	72	72	0:15/kb	1:00/kb	Elongation \downarrow
6	72	72	5:00	5:00	Finale Elongation
7	4	4	∞	∞	Pause

Die Produkte der verschiedenen PCR-Reaktionen wurden mittels Agarosegelen (3.4.3) aufgetrennt und kontrolliert.

3.4.2 cDNA Synthese mittels reverser Transkription

Für die Synthese von cDNA musste im ersten Schritt RNA aus Myzel von großer Reinheit extrahiert werden. Hierfür wurden die Kits innuPREP RNA Kit (Analytik Jena, Deutschland) und High Pure RNA Isolation Kit (Roche Life Science, Deutschland) verwendet und die RNA mit zusätzlichem DNase-Verdau („DNaseI“, Thermo Fisher Scientific, USA) nach Herstellerangaben extrahiert (3.5.5).

Zur Synthese von cDNA wurden 0.5-2.5 μ g RNA mit 20mM Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primern versetzt und für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend direkt auf Eis abgekühlt und mit nachfolgenden Reagenzien vermennt (

Tabelle 7).

METHODEN

Tabelle 7: Herstellungsschema cDNA-Synthese

Reagenz	Volumen [μl]
RNA	8
10 mM OligoOligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer	2
5x RT-Reaktionspuffer	5
2mM dNTP-Mix	2
200 μl RevertAid Reverse Transkriptase	0.5
40 U/ μl RiboLock RNase Inhibitor	0.5
RNase freies <i>ddH</i> ₂ O	7

Der Ansatz wurde für 60 Minuten bei 42°C inkubiert und anschließend bei 80°C für 5 Minuten inaktiviert. Die cDNA wurde anschließend bei -20°C gelagert und für die Amplifikation von *F. graminearum* Genen (3.4.1) oder qRT-PCR genutzt (3.5.7).

3.4.3 Agarose-Gelelektrophorese

TAE Puffer (1\times)	40 mM Tris-Acetat
pH 8.3	1 mM EDTA

Je nach Größe wurden DNA und RNA Fragmente in 1-2 %igen (w/v) Agarosegelen mit einer Ethidiumbromidkonzentration von 0.2 $\mu\text{g/ml}$ bei 80-130 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proben wurden mit 6 \times Probenpuffer (Gel Loading Dye, Purple, NEB Deutschland) versetzt. Als Marker diente der Thermo Scientific™ GeneRuler 1kb+ DNA Ladder. Die Detektion der PCR Produkte erfolgte mittels GelJet Imager (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland). Zur Isolation von DNA-Fragmenten wurde die gewünschte Bande nach gelelektrophoretischer Auftrennung unter UV-Licht (254 nm) mittels Skalpell ausge schnitten und anschließend gereinigt (3.4.7).

3.4.4 Plasmidisolation aus *E. coli*

Resuspensionspuffer	25 mM Tris-HCl
pH 8.0	50 mM Glukose
	10 mM EDTA
	100 $\mu\text{g/ml}$ RNase

Mix 2	200 mM NaOH
	1% (w/v) SDS

METHODEN

Mix 3 pH 4.8	3 M Natriumacetat Eisessig
TE-Puffer pH 8.0	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA

Die alkalische Lyse zur Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* wurde mit 2 ml Übernachtskulturen in antibiotikahaltigem LB-Flüssigmedium durchgeführt (2.3). Hierzu wurde die Kultur in einem 2 ml Reaktionsgefäß bei 13000 rpm (Centrifuge MiniSpin, Eppendorf Deutschland) für 1 min pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 200 µl kaltem Resuspensionspuffer aufgenommen und resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 µl Mix 2. Die Probe wurde 3-mal invertiert und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl Mix 3 wurde die Probe 8-mal invertiert und ebenfalls für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 3 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde zusammen mit 900 µl Ethanol abs. in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt, 25-mal invertiert und 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Hierzu wurde die Probe 5 Minuten auf Eis inkubiert und 3 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde abschließend für ca. 5-10 Minuten bei 55°C getrocknet und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

Zur Plasmidisolierung mit höherer Reinheit wurde das NucleoSpin® Plasmid Easy Pure Kit von Macherey-Nagel (Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet.

Um größere Mengen Plasmid-DNA zu gewinnen, wurde das NucleoBond® Xtra Midi Kit von Macherey-Nagel (Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet.

Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde anschließend photometrisch bestimmt (3.4.9).

3.4.5 Restriktionsverdau von DNA

Zum Verdau von DNA und PCR-Fragmenten über Restriktionsendonukleasen wurden die Enzyme und Puffersysteme von NEB (Deutschland) und Thermo Fisher Scientific (USA) verwendet. In **Tabelle 8** ist der Ansatz dargestellt, der so oder als ein Vielfaches davon hergestellt wurde.

METHODEN

Tabelle 8: Ansatz Restriktionsverdau

Reagenz	Volumen [μ l]	Menge [μ g]
10x Puffer	2	0.2-1
DNA		
10 U/ μ l Restriktionsendonuklease(n)	0.5	
ddH ₂ O	ad 20	

Ansätze für den Restriktionsverdau von DNA oder PCR-Fragmenten wurden für 1-16 Stunden inkubiert. Die Inkubationstemperatur war von den jeweiligen Restriktionsendonukleasen abhängig und lag zwischen 25°C - 65°C. Optional erfolgte nach der Inkubationszeit eine Inaktivierung der Enzyme für 20 Minuten bei 65°C - 85°C. Zur Überprüfung wurde der gesamte Ansatz oder ein 3 μ l Aliquot davon gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.4.3).

3.4.6 Modifikation von DNA-Fragmenten

Die Enden von PCR-Fragmenten oder verdauten DNA-Fragmenten wurden auf unterschiedliche Weise modifiziert.

Zur Entfernung von inkompatiblen 3'-Überhängen und zum Auffüllen von inkompatiblen 5'-Überhängen wurde das Quick Blunting™ Kit (NEB, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet.

Die Dephosphorylierung von Fragmentenden erfolgte mit der FastAP Thermosensitiven Alkalinen Phosphatase (Thermo Fisher Scientific, USA) nach Herstellerangaben.

Zur Phosphorylierung von PCR-Fragmenten wurde die T4 Polynukleotid Kinase von NEB (Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet.

3.4.7 Reinigung von DNA-Fragmenten

Die Reinigung von PCR-Produkten und die Reinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel (3.4.3) wurden mittels NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Deutschland) gereinigt. Die Reinigung erfolgte nach Herstellerangaben.

3.4.8 Fällung von DNA-Fragmenten

Für die Fällung von DNA-Fragmenten wurden die in **Tabelle 9** dargestellten Reagenzien vermengt und für 30 Minuten bei -20°C inkubiert.

Tabelle 9: Herstellungsschema Fällung von DNA-Fragmenten

Reagenz	Volumen [μl]
DNA	50
3M NaAc (pH4.8)	5
Isopropanol	35

Anschließend wurden die Ansätze für 30 Minuten bei 4°C und 13000 rpm (Fresco™ 21 Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, USA) zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets mit 200 μ l 70%igem Ethanol gewaschen. Hierbei wurde der Ansatz gevortext, für 5 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Pellets wurden für ca. 5-10 Minuten bei 55°C getrocknet und abschließend in 20 μ l - 50 μ l TE-Puffer (3.4.4) aufgenommen.

3.4.9 Photometrische Konzentrationsbestimmungen

Die Konzentrationsbestimmung für DNA erfolgte photometrisch mit dem NanoDrop™ One Mikrovolumen-UV/VIS-Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific, USA). Dabei wurde die Absorption von 2 μ l Probe bei 260 nm gemessen.

3.4.10 Ligation von Fragmenten

Zur Ligation von DNA- und PCR-Fragmenten in Vektoren (2.6) wurde die T4 DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific, USA) verwendet. In Tabelle 10 ist der Ligationsansatz dargestellt.

Tabelle 10: Ansatz der Ligationsreaktion.

Reagenz	Volumen [μl]
10x Ligationspuffer	2
50 ng Vektor-DNA	0.5 - 3
150 ng Insert-DNA	1 - 6
T4 DNA-Ligase	1
ddH ₂ O	ad 20

Die Ligation erfolgte bei 16°C über Nacht oder über das Wochenende bei 4°C.

METHODEN

3.4.11 Transformation in *E. coli*

Die Transformation der Ligationsansätze (3.4.10) erfolgte in 100 µl chemisch kompetente *E. coli* TOP10-Zellen (zur Verfügung gestellt von B. Hädeler). Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut und anschließend für 20 Minuten mit 20 µl Ligationsansatz auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 30 Sekunden bei 42°C, woraufhin der Transformationsansatz nochmals für 1 Minute auf Eis inkubiert wurde. Die Zellen wurden in 300 µl LB- oder SOB-Medium (2.3) aufgenommen und für 45-60 Minuten bei 37°C und 500 rpm regeneriert. Anschließend wurden die Ansätze auf LB-Platten mit entsprechenden Selektionsmarkern ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C. Der Erfolg der Transformationen wurde jeweils mittels Kolonie PCR (3.4.1) überprüft.

3.4.12 DNA-Sequenzierung

Erforderliche Sequenzierungen wurden von Eurofins Genomics durchgeführt.

3.4.13 Anzucht und Lagerung von *E. coli*

E. coli wurde je nach Selektionsvektor auf LB-Platten oder in Flüssigkultur mit passendem Antibiotikum kultiviert (2.3). Die Anzucht erfolgte über Nacht bei 37°C und 180 rpm. Die Kultivierung in Flüssigkultur erfolgte zur Plasmid-Isolierung (3.4.4) in 3-100 mL LB-Medium mit einer Kolonie, 20 µl Flüssigkultur oder einem bei -20°C gelagertem Bakterienpellet.

3.5 Herstellung und molekulare Analyse pilzlicher Transformanten

3.5.1 Protoplasten-Transformation von *Fusarium graminearum*

Enzymlösung	3.5%	Driselase® von <i>Basidiomycetes sp.</i> (Sigma-Aldrich)
	3.5%	Lytische Enzyme von <i>Trichoderma harzianus</i> (Sigma-Aldrich)
	0.7M	NaCl
STC-Co-Puffer pH 8.0	20%	Saccharose
	10mM	Tris-HCl
	50mM	CaCl ₂
PEG -Co	40%	PEG4000
	60%	STC-Co-Puffer

METHODEN

Zur Vorbereitung der Transformation wurden 12 µg des zu transformierenden Konstruktes mittels Restriktionsendonukleasen linearisiert bzw. im Falle einer homologen Rekombination an den Enden der Erkennungssequenzen verdaut (3.4.5). Zudem wurden 1×10^6 Konidien des gewünschten *F. graminearum* Stammes in 50 ml YEPE-Flüssigmedium (2.3) über Nacht bei 28°C und 150 rpm inkubiert. Das ausgekeimte Myzel wurde anschließend über ein Wilson-Sieb (Greiner, Österreich, 70 mesh) gefiltert und mit 50 mL sterilem *ddH*₂O gewaschen und auf einem sterilen Filterpapier getrocknet. Die Enzymlösung wurde frisch angesetzt, für 30 Minuten gerührt und anschließend bei 4000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen 0.2 µm Filter sterilfiltriert. Zur Protoplastierung wurden 0.2-0.5 g Myzel mit 10 mL steriler Enzymlösung gemischt und für 2.5 h bei 30°C und 80 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Protoplasten durch ein Wilson-Sieb (Greiner, Österreich, 40 mesh) filtriert und bei 2000 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig mit 10 mL STC-Co-Puffer gewaschen und bei 2000 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Die Protoplasten wurden mittels Neubauer-Zählkammer gezählt und mit einer Konzentration von 1×10^8 Protoplasten/mL resuspendiert.

Für die Transformation wurden 200 µl Protoplasten (2×10^7) in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen mit 30 µl des verdauten DNA-Konstruktes gemischt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 1ml PEG-Co vorsichtig mit dem Ansatz gemischt und 20 Minuten bei RT inkubiert. Zur Regeneration wurden 5 mL TB3 zum Ansatz hinzugegeben und 30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit auf 50°C abgekühlter TB3-Agar auf 50 ml aufgefüllt und durch Invertieren mit dem Protoplastenansatz gemischt. Je 10 mL des Ansatzes wurden in 5 Petrischalen (Ø 96 mm) gegossen und über Nacht bei 28°C regeneriert. Anschließend wurden die Platten zur Selektion der Transformanten mit antibiotikahaltigem H₂O-Festmedium (2.3) überschichtet (**Tabelle 11**). Die Platten wurden für 1-4 Tage bei 28°C inkubiert. Bei erfolgreicher Transformation konnten gewachsene Transformanten von der Platte auf eine weitere antibiotikahaltige Selektionsplatte umgesetzt und weiter inkubiert werden.

Tabelle 11: Antibiotikakonzentrationen des H₂O-Festmediums

Antibiotikum	Konzentration in H ₂ O-Medium [µg/ml]	Endkonzentration [µg/ml]
Hygromycin B	500	250
Nourseothricin	200	100

METHODEN

Antibiotikum	Konzentration in H ₂ O-Medium [µg/ml]	Endkonzentration [µg/ml]
Geneticin	200	100

3.5.2 Phire PCR

Ein erstes Screening der Transformanten, die mittels homologer Rekombination entstanden, auf molekularer Ebene erfolgte über das Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Hierzu wurde Myzel der Transformanten (3.5.1) den Herstellerangaben entsprechend aufgearbeitet und die extrahierte DNA mit resistenz- bzw. genspezifischen Primern (2.5) analysiert.

Tabelle 12: Herstellungsschema Phire PCR-Ansatz

Reagenz	Volumen [µl]
2x Phire Plant Direkct PCR Master Mix	12.5
10 µM Primer 1	1
10 µM Primer 2	1
DNA	2
ddH ₂ O	8

In **Tabelle 12** ist das Herstellungsschema eines Phire PCR-Ansatzes und in **Tabelle 13** das Thermocycler-Programm dargestellt.

Tabelle 13: Thermocycler-Programm für Phire-PCR.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Phase
1	99		Deckel erhitzen
2	98	5:00	Initiale Denaturierung
3	98	0:05	Denaturierung
4	~60	0:05	Annealing
5	72	0:10/kb	Elongation
6	72	4:00	Finale Elongation
7	10	∞	

3.5.3 DNA-Extraktion mittels CTAB

CTAB-Extraktionspuffer pH 8.0	2% (w/v)	CTAB
	100 mM	Tris-HCl
	20 mM	EDTA
	1,4 M	NaCl

METHODEN

Zur Extraktion von genomischer DNA aus Pilzmyzel wurde in CM-Flüssigkultur angezogenes Myzel (3.1.2) auf Graupapier ausgedrückt und so vom Medium befreit. Anschließend wurde das getrocknete Myzel unter Stickstoff gemörsert. Etwa 100 mg gemörsertes Myzel wurden in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 900 µl CTAB-Extraktionspuffer versetzt und gevortext. Der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 65°C inkubiert und anschließend bei 13000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert (Centrifuge MiniSpin, Eppendorf, Deutschland). Der Überstand wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 900 µl Chloroform durch Invertieren vermischt und für 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 700 µl Isopropanol durch Invertieren vermischt. Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei -20°C gefällt und anschließend bei 13000 rpm und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert (Fresco™ 21 Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, USA). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde der Ansatz für 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde für 5-10 Minuten bei 55°C getrocknet und über Nacht bei 55°C und 300 rpm in TE-Puffer (3.4.4) resuspendiert.

3.5.4 Southern Blot

20× SSC-Puffer	3 M NaCl 300 mM Natriumcitrat
Prähybridisierungspuffer	5× SSC-Puffer 0.1 % N-Laurylsarkosin 0.2 % SDS 2 % Blockierungsreagenz (Roche Diagnostics, Deutschland)
Hybridisierungspuffer	DIG-markierte Sonde in Prähybridisierungspuffer
W1-Puffer	2 × SSC-Puffer 0.1 % SDS
W2-Puffer	0.2 × SSC-Puffer 0.1 % SDS
5× B1-Puffer pH 7.5	500 mM Maleinsäure 43,83g NaCl

METHODEN

B2-Puffer	1 × B1-Puffer 1% Blockierungsreagenz
Antikörperlösung	Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments (Roche Diagnostics, Deutschland), 1:10.000 verdünnt in B2-Puffer
Waschpuffer	1 × B1-Puffer 0.3% Tween 20
B3-Puffer pH 9.5	100 mM Tris-HCl 100 mM NaCl
CSPD	Chemilumineszenz-Substrat CSPD (Roche Diagnostics, Deutschland), 1:100 verdünnt in B3-Puffer
Depurinationspuffer	250 mM HCl
Denaturierungspuffer	500 mM NaOH 1.5 M NaCl
Neutralisierungspuffer pH 7.5	500 mM Tris-HCl 1.5 M NaCl

Genomische DNA wurde über Nacht mittels Restriktionsendonukleasen (3.4.5) in spezifische DNA-Fragmente geschnitten, gefällt (3.4.8) und in 30-60 µl TE-Puffer (3.4.4) aufgenommen. Die restringierte DNA wurde anschließend über ein Agarosegel (3.4.3) aufgetrennt und das Gel anschließend für jeweils 10 Minuten in Depurinations-, Denaturierungs- und Neutralisierungspuffer inkubiert. Die DNA-Fragmente wurden anschließend mittels Kapillarkräften über Nacht auf eine Nylonmembran (Amersham Hybond-NX, GE Healthcare Life Sciences, Schweden) übertragen. Dazu wurde das Gel auf eine 20× SSC-Puffer getränkte Whatman-Filterpapierbrücke (Rotilabo®-Blottingpapier, Dicke 0.35 mm, Roth, Deutschland) platziert. Die Enden des Filterpapiers hingen in einer mit 20× SSC-Puffer befüllten Schale. Auf das Gel wurde die mit 2× SSC-Puffer äquilibrierte Nylonmembran luftblasenfrei gelegt. Es wurden ebenfalls vier in 2× SSC-Puffer getränkte Whatman-Paper nacheinander und luftblasenfrei sowie ein Stapel Graupapier auf das Gel gelegt. Je nach Größe des Gels wurden zur zusätzlichen Beschwerung ca. 500g an Gewicht auf dem Graupapier platziert.

Am folgenden Tag wurde die Membran mit 2× SSC-Puffer gespült und anschließend die DNA-Fragmente mittels UV-Crosslinker (1200 mJ/cm; UV Stratalinker 2400, Stratagene,

METHODEN

USA) auf der Membran fixiert. Die fixierte Membran wurde in ein Hybridisierungsröhrchen überführt und für 2 Minuten mit 2× SSC-Puffer rotierend inkubiert (Stuart™ Roller Mixer SRT1, Bibby Scientific, UK). Anschließend wurde die Membran für 5 Stunden im Hybridisierungssofen (400 HY-E Hybridisierungssofen, Bachofer, Reutlingen) bei 68°C in 20 ml Prähybridisierungspuffer inkubiert.

Parallel erfolgte die Herstellung der DIG-markierten Sonde. Hierfür wurden spezifische DNA-Fragmente von Plasmid- oder genomischer DNA mittels oneTaq® DNA Polymerase (NEB, Deutschland) und Didoxigenin-11-UTPs (Roche Diagnostics, Deutschland) amplifiziert. Der PCR-Ansatz ist in **Tabelle 14** dargestellt.

Tabelle 14: Herstellungsschema PCR-Ansatz DIG-markierte Sonde.

Reagenz	Volumen [µl]
2x OneTaq Master Mix with Standard Buffer	12.5
10 µM Primer 1	0.5
10 µM Primer 2	0.5
10 µM Didoxigenin-11-UTPs	1.5
DNA	1
ddH ₂ O	9

Anschließend erfolgte die Amplifikation des Reaktionsansatzes. Das Thermocycler-Programm ist in **Tabelle 15** dargestellt.

Tabelle 15: Thermocycler-Programm OneTaq-PCR.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Phase
1	99		Deckel erhitzen
2	95	0:30	Initiale Denaturierung
3	95	0:30	Denaturierung
4	~60	0:30	Annealing
5	68	1:00/kb	Elongation
6	68	5:00	Finale Elongation
7	10	∞	

Der Hybridisierungspuffer entsteht indem die DIG-markierte Sonde (**Tabelle 16**) mit 25 ml Prähybridisierungspuffer versetzt wird. Anschließend wird der Hybridisierungspuffer für 10 Minuten bei 95°C denaturiert und dann sofort für 10 Minuten auf Eis gekühlt. Der Prähybridisierungspuffer wird durch den Hybridisierungspuffer ersetzt und über Nacht bei 68°C im Hybridisierungssofen inkubiert.

METHODEN

Tabelle 16: Tabelle der in dieser Arbeit verwendeten DIG markierten Sonden.

Name Sonde	Primer 1	Primer 2
PKS12 RF	PKS12 RF F	PKS12 RF R
Hex-1 LF	Hex1 LF F	Hex1 LF R
SO RF	FGSG_13060 down F	FGSG_13060 down R
mCherry	mCherry F	mCherry R

Am folgenden Tag wurde der Hybridisierungspuffer entfernt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Membran wurde zweimal für 5 Minuten mit 50 ml W1-Puffer bei RT im Hybridisierungsröhrchen rotierend gewaschen. Parallel wurden 50 ml W2-Puffer auf 68°C aufgeheizt und anschließend erfolgten zwei Waschschrirte der Membran mit jeweils 25 ml W2-Puffer für 15 Minuten bei 68°C im Hybridisierungssofen. Die Membran wurde daraufhin im Hybridisierungsröhrchen mit WP-Puffer gespült und mit 15 ml B2-Puffer für 60 Minuten rotierend inkubiert. Anschließend wurde der B2-Puffer durch 15 ml Antikörperlösung ersetzt und für 30 Minuten ebenfalls bei RT rotierend inkubiert. Die Membran wurde dreimal für 20 Minuten mit 50 ml WP-Puffer rotierend gewaschen und abschließend für 5 Minuten in 15 ml B3 Puffer äquilibriert. Für die Detektion wurde die Membran auf eine Plastikfolie platziert und mit ca. 500 µl CSPD-Lösung überschichtet, eingeschweißt und für 5 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Es folgte eine weitere Inkubation für 15 Minuten bei 37°C im Dunkeln. Die Chemolumineszenz wurde anschließend mittels ChemiDoc™Touch Imaging System (Bio-Rad, USA) detektiert.

3.5.5 RNA-Extraktion aus Myzel

Homogenisierungspuffer	4 M	Guanidinthiocyanat
pH 5.2	200 mM	Natriumacetat
	25 mM	EDTA
	1 M	Kaliumacetat
	2.5% (w/v)	PVP 40
NLS	10% (w/v)	N-Laurylsarcosin
Waschpuffer	10 mM	Tris-HCl
pH 7.5	0.5 mM	EDTA
	50 mM	NaCl
	50% (w/v)	Ethanol

METHODEN

Natriumiodid	0.15 mM	Na ₂ SO ₃
	6 M	NaI

Silica-Partikel
pH 2.0

60 g Silica-Partikel (S5631, Sigma-Aldrich, USA) wurden in 500 ml *ddH₂O* aufschütteln. Nach Absetzen der Partikel über Nacht wurden 470 ml des Überstands abgesaugt und verworfen. Weiter 500 ml *ddH₂O* wurden zugegeben und vermischt. Nach 5 Stunden hatten sich die Partikel erneut abgesetzt und etwa 440 ml Überstand wurden abgesaugt und verworfen. Die restliche Suspension wurde mit HCl auf einen pH-Wert von 2.0 eingestellt und aliquotiert.

Zur Extraktion von RNA aus virusinfiziertem Myzel wurde eine modifizierte Methode nach (Rott & Jelkmann, 2001) verwendet.

Dazu wurde Myzel aus einer CM_Flüssigkultur (3.1.2) durch Ausdrücken zwischen Graupapier von Medienresten befreit und unter Stickstoff gemörsert. 100 mg Myzel wurden in 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt und mit 500 µl Homogenisierungspuffer sowie 100 µl NLS versetzt. Es erfolgte eine Inkubation für 10 Minuten bei 70°C. Anschließend wurde die Probe für 10 Minuten bei 13000 rpm (Centrifuge MiniSpin, Eppendorf, Deutschland) zentrifugiert und 300 µl des Überstands in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde mit 300 µl Natriumiodid, 150 µl absolut Ethanol und 25 µl Silica-Partikeln versetzt und bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schütteln für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Probe bei 6000 rpm für 1 Minute zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µl Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die Probe bei 6000 rpm für 1 Minute zentrifugiert und das Pellet getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 80 µl *ddH₂O* aufgenommen und bei 70°C für 4 Minuten inkubiert. Die Probe wurde bei 13000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert und 70 µl des Überstands in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Wurde RNA größerer Reinheit benötigt, wurde das Kit „peqGOLD Trifast™“ von VWR Life Science Competence Center (Deutschland) verwendet. Die Extraktion erfolgte nach Angaben des Herstellers, wobei von 100 mg in Stickstoff gemörsertem Myzel ausgegangen wurde.

Nach beiden Verfahren wurde die RNA mittels Gelelektrophorese (3.4.3) kontrolliert und die Konzentration photometrisch (3.4.9) bestimmt.

METHODEN

3.5.6 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

PBS (10x) pH 7.4	137 mM NaCl 1.5 mM KH ₂ PO ₄ 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ 2.7 mM KCl
PBS-T pH 7.4	0.05% (w/v) Tween-20 in PBS
Beschichtungspuffer	0.01 M Natriumdiethyldithiocarbamat (DIECA) in PBS
Blockierungslösung	2.5 Magermilchpulver in PBS
Konjugationspuffer	2% (w/v) Polyvinylpyrrolidon 0.2% (w/v) Albumin (Hühnereiweiß)
Substratpuffer pH 9.5	9.7 ml Diethanolamin 0.5 mM MgCl ₂ ad 100 ml ddH ₂ O
Substrat-Färbelösung	1mg/ml p-Nitrophenylphosphat in Substratpuffer

Mittels ELISA ist die quantitative Immundetektion von Proteinen möglich. Zur Bestimmung der quantitativen Viruslast in verschiedenen Myzelproben wurde hierbei die Methode des indirekten ELISAs angewendet. Zur relativen Berechnung der Viruslast wurden Eichkurven von Gemischen aus virusfreiem Pilzmyzel und Polysomen aus virusinfiziertem Myzel erstellt und 1:250 bis 1:5000 verdünnt. Die 1:250 Verdünnung wurde als 100% Standard festgelegt und zusammen mit Positiv- und Negativkontrollen bei jeder Messung mitgeführt. Die 1:1000 Verdünnung diente als Schwellenwert (= ~10%). Messungen mit einem geringeren Wert als 10% wurden als nicht messbare Viruslast definiert. Alle Proben wurden als technische Dreifachreplikate analysiert.

Die Aufbereitung des auf CM-Cellophan-Platten angezogenen Myzels (3.1.1) erfolgte, indem Myzel von den Platten geerntet und in Extraktionstüten (Extraction Bags Universal, Bioreba, Schweiz) zusammen mit Beschichtungspuffer zerkleinert und auf eine

METHODEN

Konzentration von 1 mg/ml eingestellt wurde. Anschließend wurden 100 µl der Proben als Triplikate auf 96-well ELISA Platten (Greiner-Cellstar-96-Well-Platten, Greiner Bio-One GmbH, Österreich) aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Entfernung restlicher ungebundener Myzelbestandteile wurden die Platten dreimal für je 5 min mit PBS-T gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Platten mit je 200 µl Blockierungslösung befüllt und schüttelnd für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit 100 µl des 1:4000 in Konjugationspuffer verdünnten Primärinterferons AS0115 (2.4) befüllt und für 2 Stunden schüttelnd inkubiert. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Platten dreimal für je 5 min mit PBS-T gewaschen. Die Inkubation von 100 µl des 1:20,000 in Konjugationspuffer verdünnten sekundären, an alkalische Phosphatase gekoppelten Anti-Antikörper (2.4) erfolgte über Nacht bei 4°C. Zur Entfernung ungebundener Antikörper wurden die Platten dreimal für je 5 min mit PBS-T gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl der frisch angesetzten Substrat-Färbelösung. Die Detektion des gelben Substratumsatzes erfolgte nach 5 Stunden bei 405 nm am Mitras² LB 943 Multimode Reader (Berthold Technologies, Deutschland).

3.5.7 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Zur Bestimmung der relativen mRNA Transkriptionslevel wurde die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Alle Messungen erfolgten unter Verwendung des RT2 SYBR[®] Green qPCR Mastermix und dem Rotor-Gene[®] Q (Qiagen, Venlo, Niederlande). Jede cDNA-Probe wurde 1:10 verdünnt und 2 µl wurden für jede Messung verwendet (**Tabelle 17**).

Tabelle 17: Herstellungsschema PCR-Ansatz für qRT-PCR

Reagenz	Volumen [µl]
RT2 SYBR [®] Green qPCR Mastermix	5
10 µM Primer 1	0.5
10 µM Primer 2	0.5
cDNA	2
H ₂ O	2

40 Zyklen eines spezifischen PCR-Programms wurden verwendet, um das gewünschte Produkt zu amplifizieren (**Tabelle 18**). Zur relativen Berechnung wurde das β-Tubulin (FGSG_06611) Gen bei jeder Messung und von jeder Probe als Transkriptionsstandart mitgeführt. Die Primer (2.5) der Gene und Referenzgene wurden auf eine

METHODEN

Annealing-Temperatur von 60°C optimiert. Zyklus- (Ct) und Amplifikationseffizienzwerte (E) wurden mit dem Rotor-Gene® Q v2.3.1.49 (Qiagen, Venlo, Niederlande) Software ermittelt. Die Berechnungen und Analyse der $\Delta\Delta C_t$ -Werte erfolgten gemäß (Hellemans *et al.*, 2007).

Tabelle 18: Thermocycler-Programm qRT-PCR.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Phase
1	95	5:00	Initiale Denaturierung
2	95	0:10	Denaturierung
3	60	0:30	Annealing and Elongation
4	65-95	0:05 °C ⁻¹	Elongation

} ×40

3.6 Phänotypische Analyse pilzlicher Transformanten

3.6.1 Wachstumstest auf Festmedium

Für alle Wachstumstest wurden Kontrollen mit dem *F. graminearum* Wildtypstamm FgPH1 (2.2.2) mitangesetzt. Es erfolgten Wachstumstests von virusinfizierten und virusfreien Mutanten auf CM-Festmedium, CM-Induktionsfestmedium, Minimalmedium und Minimalinduktionsmedium (2.3) durchgeführt.

3.6.2 Perithezienproduktion

2.5% Tween 60

2.5% (v/v) Tween 60
in *ddH₂O*

Zur Produktion von Perithezien wurden Kontrollen mit dem *F. graminearum* Wildtypstamm FgPH1 (2.2.2) mitangesetzt. Es erfolgten Tests zur Perithezienbildung von virusinfizierten und virusfreien Mutanten auf Karottenagar (2.3) nach (Klittich & Leslie, 1988). Hierzu wurden ca. 3 mm² von auf Festmedium gewachsenem Myzel (3.1.1) ausgeschnitten und auf Karottenagar gesetzt. Die Platten wurden bei 25°C unter 12 Stunden UV-Licht pro Tag inkubiert. Jeweils nach 7 Tagen wurde Luftmyzel mittels 1 mL sterilem 2.5% (v/v) Tween 60 Lösung entfernt. Dies wurde so oft wiederholt, bis Perithezien gebildet wurden. Nach 6 Wochen wurde der Versuch beendet.

3.6.3 Infektionsstudien auf Weizenähren

Zur Überprüfung der Pathogenität eines *Fusarium*-Stammes und der erstellten Mutanten auf Weichweizen (*Triticum aestivum* cv. Nandu; 2.2.3) wurden gerade erblühte Ährchen mit Konidien (3.1.4) des zu untersuchenden *F. graminearum*-Stammes inokuliert.

Hierzu wurden 10 µl einer Konidiensuspension (50 Konidien/µl) zwischen Hüllspelze (Gluma) und Vorspelze (Palea) pipettiert. Pro Ähre wurden zwei mittig- und gegenüberliegende Ährchen inokuliert. Die ersten 3 Tage nach Inokulation wurden die behandelten Ähren mit einer mit ddH₂O befeuchteten Tüte umhüllt.

Nach 21 dpi wurden die Ähren geerntet, dokumentiert und die Anzahl der Ährchen mit Infektionssymptomen pro Ähre gezählt.

Zur Überprüfung des Verbreitungsgrades des Myzels und damit der Infektion innerhalb der Ähre wurden mit einer Rasierklinge Längsschnitte inokulierter Ährchen 4-12 dpi angefertigt, dokumentiert und mikroskopiert (Leica MZ FL III, Leica Mikrosysteme GmbH, Deutschland).

3.6.4 Analyse von Infektionskissen auf Weizenähren

Färbelösung 0.1% (w/v) Trypanblau
 in Essigsäure (45%)

Zur Analyse von Infektionsstrukturen wurden mehrere gerade erblühende Ährchen des Weichweizens (*Triticum aestivum* cv. Nandu; 2.2.3) mit Konidien (3.1.4) des zu untersuchenden *F. graminearum*-Stammes inokuliert.

Hierzu wurden 10 µl Konidiensuspension (50 Konidien/µl) zwischen Gluma und Palea pipettiert. Die ersten 4 Tage nach Inokulation wurden die behandelten Ähren mit einer mit ddH₂O befeuchteten Tüte umhüllt und nach 4-8 dpi geerntet.

Zur mikroskopischen Betrachtung der auf dem Weizen gewachsenen Infektionsstrukturen wurde das Myzel mit Trypanblau angefärbt. Hierzu wurden die infizierte Gluma und Palea heraus präpariert und zunächst über Nacht in 96% Ethanol (technisch) entfärbt. Anschließend wurden die Spelzen für 5 Minuten bei RT in der Färbelösung inkubiert und kurz in 45% Essigsäure (v/v) sowie ddH₂O gespült. Die Infektionsstrukturen auf den Spelzen wurden anschließend mikroskopiert (Leica MZ FL III, Leica Mikrosysteme GmbH, Deutschland) und dokumentiert.

3.6.5 Auskeimungstest und Vereinzeln von Konidien

Um zu überprüfen, wie viel Konidien (3.1.4) keimungsfähig sind, wurden 10 µl (20 Konidien/µL) einer Konidien suspension auf H₂O-Festmedium (2.3) ausplattiert und 4 bis 20 Stunden bei RT inkubiert. Die ausgekeimten Konidien wurden unter einem Stereomikroskop (AZ100, Multizoom, Nikon GmbH, Deutschland) ausgezählt.

Um Konidien zu vereinzeln wurden 100 µl (5 Konidien/µl) auf H₂O-Festmedium (2.3) ausplattiert und über Nacht bei 28°C inkubiert. Anschließend wurden einzelne frisch gekeimte Konidien identifiziert, mit einem Skalpell ausgeschnitten und auf CM-Festmedium (2.3) umgesetzt. Anschließend erfolgte die Inkubation im Dunkeln bei 28°C für ca. 3 Tage.

3.7 Fluoreszenzmikroskopie

3.7.1 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

Für die subzelluläre Lokalisation von Fusionsproteinen in FgPH1 Myzel (3.1.2) und Konidien (3.1.4) wurde die Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie unter der Verwendung der Leica TCS SP8 konfokalen Plattform (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) durchgeführt. Zur Detektion von eGFP-Fusionskonstrukten wurden die Zellen mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt, um anschließend die eGFP-Fluoreszenz im Detektionsfenster von 495 nm bis 527 nm aufzunehmen. Für die Detektion von mCherry-Fusionskonstrukten wurden die Zellen mit einer Wellenlänge von 561 nm angeregt, um anschließend die mCherry-Fluoreszenz im Detektionsfenster von 569 nm bis 595 nm aufzunehmen.

3.7.2 Fluoreszenzmikroskopie am Axio Imager Z1

Für die Analyse morphologischer Eigenschaften und zum Vorscreening von Transformanten mit fluoreszenzmarkierten Fusionsproteinen in FgPH1 Myzel und Konidien (3.1) wurde das Fluoreszenzmikroskop Axio Imager Z1 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) genutzt. Fusionsproteine mit GFP wurden bei Wellenlängen von 450 bis 490 nm angeregt und bei 500 bis 550 nm detektiert. Fusionsproteine mit mCherry wurden bei Wellenlängen von 538 bis 562 nm angeregt und bei 570 bis 640 nm detektiert. Bilder wurden mit der Zeiss AxioCam MRm CCD Kamera aufgenommen. Die Bildbearbeitung erfolgte mit der Zeiss Axio Vision Software.

3.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen: Microsoft Excel, Origin2021b und RStudio (2.7). Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes.

Zur statistischen Bestimmung der Signifikanzlevel wurden alle Variablen zunächst grafisch mittels Q-Q-Diagramm auf Normalverteilung geprüft. Anschließend erfolgte eine einfaktorielle ANOVA (*analysis of variance*). Zusätzlich wurden paarweise t-Tests und die Bonferroni-Korrektur angewandt. Signifikanzlevel sind wie folgt angegeben: $p < 0.001$ '***', $p < 0.0$ '**', $p < 0.05$ '*', $p > 0.05$ 'kein signifikanter Unterschied'.

Zur Ermittlung der relativen Streuung wurde der Variationskoeffizient ($VK = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\%$), der angibt, wie viel Prozent des Durchschnitts die Standardabweichung beträgt, berechnet. Wobei s die Standardabweichung und \bar{x} das arithmetische Mittel darstellt.

3.9 Phylogenetische Analyse

Sequenzvergleich und phylogenetische Analyse wurden in MEGA X (Version 10.2.4 Kumar *et al.*, 2018b) durchgeführt. Für die Analyse wurde der *Clustal Omega* Algorithmus mit Standard Einstellungen genutzt. Ein Bootstrap Test mit 15 Aminosäuresequenzen für die Konstruktion eines Maximum-Likelihood (ML) Baums wurde durchgeführt. Hierfür wurde das Model von Jones *et al.* (1992) und eine Gamma-Verteilung von 5 (JTT+G) genutzt. Die phylogenetische Analyse wurde durch ein Sequenzalignment der SO Proteinsequenzen – gefunden in BLASTp (Altschul *et al.*, 1997) – verschiedener Ascomyzeten durchgeführt.

4. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zwei Proteine in *F. graminearum*, die möglicherweise einen Einfluss auf die Ausbreitung von Viruspartikeln in Konidien haben, identifiziert werden. Anschließend sollte die Funktion der Proteine hinsichtlich ihrer morphologischen Eigenschaften, der Infektiosität auf Weizen und der Ausbreitung des FgV-ch9 in Myzel und Konidien untersucht werden.

4.1 Identifizierung von Hex-1 und SO

In dieser Arbeit wurden zwei Proteine identifiziert, die mit septalen Poren der Wirtszelle assoziiert sind. Das Hex-1 und das SO könnten als septale Proteine für einen regulierten Transport des Virus in die Konidien verantwortlich sein und wurden daher im Folgendem weiter analysiert.

Das Gen für das hexagonale Peroxisomen Protein Hex-1 in *F. graminearum* und seine 561 bp große kodierende Region wurden von Son *et al.* (2013) beschrieben. Auf der Grundlage dieser Daten wurden die Hex-1 Deletions- und Überexpressionskonstrukte konzipiert.

Das Protein SO von *F. graminearum* (EYB27695.1) wurde über einen Vergleich mit den publizierten Sequenzen von Fso1 aus *N. crassa* (Fleissner & Glass, 2007) und PRO40 aus *S. macrospora* (Engh *et al.*, 2007) über BLASTp (3.9) identifiziert. Beide Spezies gehören wie *Fusarium* sp. auch zur Klasse der *Sordariomycetes*. Eine phylogenetische Einordnung mittels einer Maximum-likelihood Analyse (3.9) zeigte, dass Fso1 und PRO40 eine Klade bilden, das SO Protein verschiedener *Fusarium* Arten jedoch in verschiedenen Kladen vorkommen (**Abbildung 5**). Ein Sequenzvergleich der Proteine SO und Fso1 sowie PRO40 ergab für Fso1 79% identische Aminosäuren sowie eine Abdeckung von 79% und für PRO40 76% identische Aminosäuren sowie eine Abdeckung von 81%. Zudem konnten mittels Sequenzalignments (3.9) über die gesamte Sequenz verteilte, stark konservierte Bereiche identifiziert werden. Die Sequenz (FG05 13060) wurde für die Erstellung der Deletions- und Überexpressionskonstrukte verwendet.

ERGEBNISSE

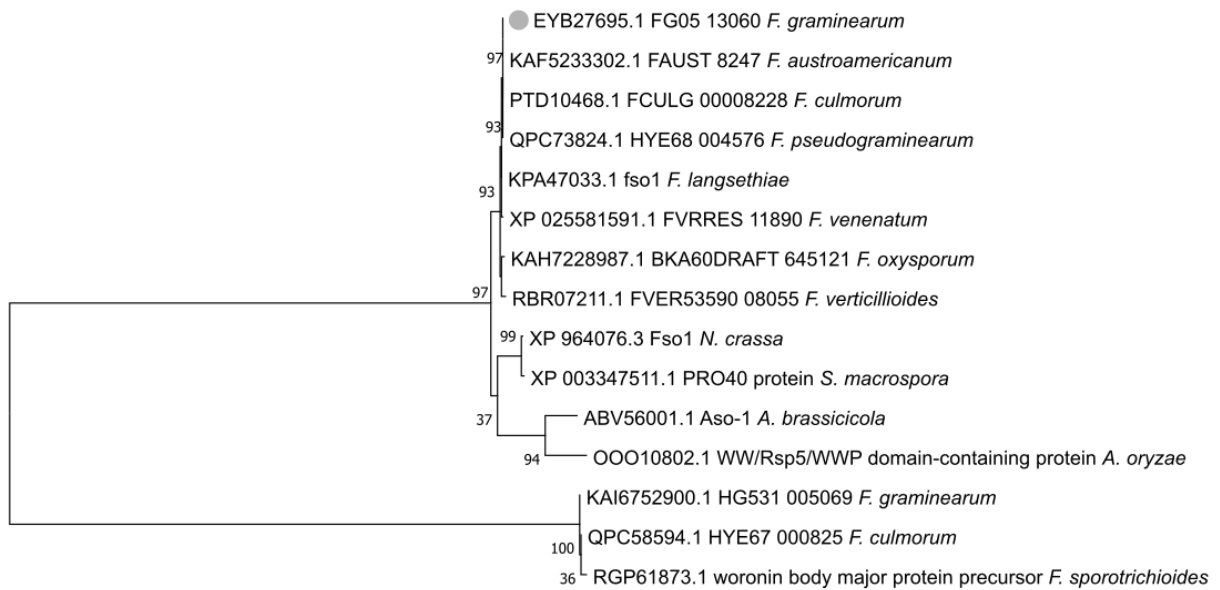


Abbildung 5: Maximum-likelihood Tree der SO Proteinsequenz von *F. graminearum* und weiterer ausgewählter Sordariomyzeten mit 1000 Bootstrap-Replikaten. Bootstrapwerte sind an den Knotenpunkten angezeigt. Der Maßstab (1) korrespondiert mit der genetischen Distanz. Der graue Punkt zeigt das SO Protein in *F. graminearum*. SO von *F. graminearum* (EYB27695.1) klustert mit SO Homologen aus *F. astroamericanum* und *F. culmorum*. Fso1 aus *N. crassa* (XP 964076.3) und PRO40 aus *S. macrospora* (XP 003347511.1) bilden eine Klade.

4.2 Klonierungs- und Transformationsstrategien

Zur Überprüfung der Hypothese, dass entweder Hex1 oder SO für die Ausbreitung des Virus im Myzel und in die Konidien verantwortlich sind, wurden Deletions- und Überexpressionsmutanten generiert und der Einfluss auf die Expression der beiden Proteine analysiert. Zur Vereinfachung der Detektion wurden alle Mutanten im Hintergrund einer Aurofusarin- und Rubrofusarin-defekten Mutante generiert (*FgΔpks12*). Die Inhibierung der Pigmentproduktion erfolgte, um eine mögliche Interferenz zwischen den beiden Pigmenten (400-550 nm) und dem mCherry Reportergen (540-590 nm) zu vermeiden. Aus der Literatur ist bekannt, dass sich die Deletion des *pks12*-Gens nicht auf weitere morphologische oder physiologische Eigenschaften des Pilzes oder die Virusinfektion auswirkt (Malz *et al.*, 2005).

Die Generierung der Mutanten wird in den folgenden Abschnitten (4.2.1 bis 4.2.7) beschrieben. Alle für die Klonierung verwendeten Primer sind in **Tabelle 2** (2.5) genannt. Die Verweise auf Standardmethoden und Vektoren sind nur in Kapitel 4.2.1 gegeben. Eine Übersicht der erstellten Konstrukte und deren Funktion zeigt **Tabelle 19**.

Tabelle 19: Übersicht der erstellten Konstrukte und deren Funktion.

Mutante	Konstrukt	Abschnitt	Funktion
<i>FgΔpks12</i>	<i>pΔpks12</i>	4.2.1	Die <i>pks12</i> Deletionsmutante kann die gelb-roten Pigmente Aurofusarin und Rubrofusarin nicht mehr produzieren. Dies resultiert in einer besseren Detektierbarkeit der Fluoreszenzfusionsproteinen.
<i>FgΔhex-1</i>	<i>pΔhex-1</i>	4.2.2	Die <i>hex-1</i> Deletionsmutante kann keine <i>Woronin bodies</i> herstellen. Analyse des Einflusses von <i>Woronin bodies</i> auf die virale Übertragungseffizienz
<i>FgΔso</i>	<i>pΔso</i>	4.2.3	Die <i>so</i> Deletionsmutante kann kein SO mehr produzieren. Analyse des Einflusses von SO auf die virale Übertragungseffizienz.
<i>FgΔhex-1/Δso</i>	<i>pΔhex-1</i> <i>pΔso</i>	4.2.4	Doppelte Deletion von <i>hex-1</i> und <i>so</i> zur Analyse eines gemeinsamen Effektes auf die virale Übertragungseffizienz.
<i>Fg_{OE}hex-1</i>	<i>p_{OE}hex-1/GFP</i>	4.2.5	GFP-markierte <i>hex-1</i> Überexpressionsmutante zur Analyse der Formierung und Lokalisation von <i>Woronin bodies</i> in

ERGEBNISSE

Mutante	Konstrukt	Abschnitt	Funktion
			Abhängigkeit einer Virusinfektion und zur Analyse der viralen Übertragungseffizienz.
Fg _{so} (Fg _{so} ↑ ^{2.3} und Fg _{so} ↓ ^{0.4})	p _{oESO} /mCherry	4.2.6	mCherry markierte so Überexpressionsmutante mit regulierbarem Promoter. Bei aktivem Promoter wird SO-mCherry konstitutiv exprimiert (Fg _{so} ↑ ^{2.3}). Bei inhibiertem Promoter wird SO-mCherry stark reduziert exprimiert (Fg _{so} ↓ ^{0.4}). Mutante wurde zur Analyse der Formierung und Lokalisation von SO in Abhängigkeit einer Virusinfektion und zur Analyse der viralen Übertragungseffizienz hergestellt.
Fg _{nativSO}	p _{nativSO} /mCherry	4.2.7	m-Cherry markierte so Mutante unter der Kontrolle des nativen so Promoters zur Analyse regulatorischer Effekte von SO durch eine Virusinfektion.

4.2.1 Herstellung der *pks12* Deletionsmutante FgΔ*pks12*

Um das *pks12* Gen im Fg-PH1 zu deletieren, wurde ein Konstrukt erstellt, welches das *pks12* Gen mit dem selektierbaren nptII Resistenzgen unter der Kontrolle des *gpdA* Promoters über homologe Rekombination flankierender Bereiche ersetzt. Hierzu wurde der *gpdA* Promoter mit dem *upstream* Bereich des *pks12* Gens fusioniert, bevor über eingebrachte Restriktionsschnittstellen erst der *downstream* Bereich des *pks12* Gens fusioniert und dann die Kassette des nptII Resistenzgens integriert wurde. Das Konstrukt wurde als **pΔ*pks12*** bezeichnet (**Abbildung 6**).

ERGEBNISSE

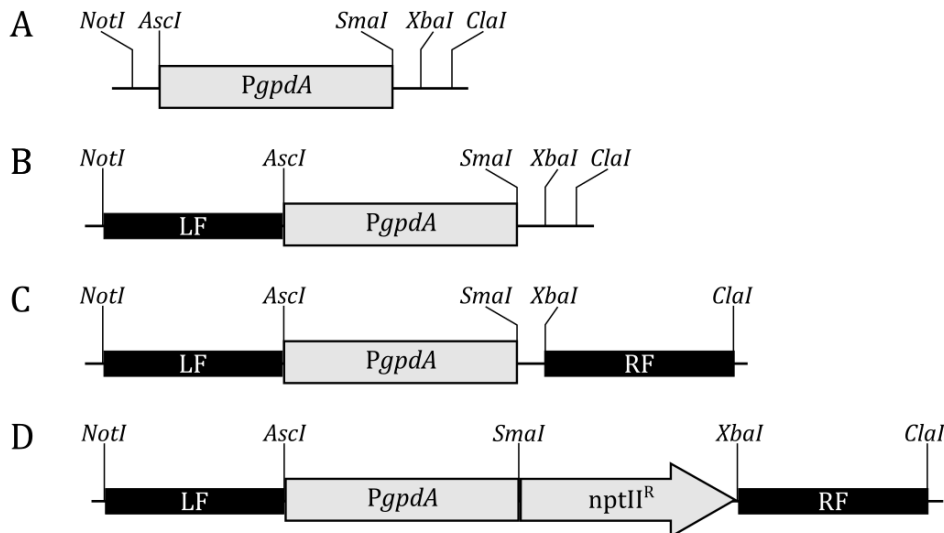


Abbildung 6: Klonierungsstrategie des pΔpks12. (A) Amplifikation und Ligation des *gpda* Promotors (Pgpda) in pJET1.2 (pJET1.2/Pgpda). (B) *AscI/NotI* Fusionierung des upstream-Bereiches (=Linke Flanke, LF) des *pks12* Gens (pJET1.2/gpda/LF). (C) *ClaI/XbaI* Fusion des downstream-Bereiches (=Rechte Flanke, RF) des *pks12* Gens mit pJET1.2/gpda/LF (pJET2.1/gpda/LF/RF). (D) *SmaI/XbaI* Fusion der *nptII* Resistenzkassette (*nptII^R*) mit pJET1.2/gpda/LF/RF (pΔpks12).

Der *gpda* Promoter (2140 bp) wurde aus pAN7.1 (2.6) mit den Primern 1 und 2 amplifiziert und dabei dem Amplifikat Erkennungsstellen für *AscI* und *SmaI* hinzugefügt. Das PCR-Produkt wurde in pJET1.2 (2.6) ligiert. Die nach der Transformation (3.4.11) in *E.coli* (2.2.1) erhaltenen Kolonien wurden mit den Primern 3 und 2 auf Einbau und Orientierung getestet. Positive Klone mit einem Amplifikat von 2210 bp wiesen eine Integration in 5'-3' Orientierung auf (**Abbildung 6A**). Das Plasmid eines positiv getesteten Klons (pJET1.2/gpda) wurde sequenziert (3.4.12).

Ein Bereich von 957 bp upstream vom *pks12* Gen wurde aus *F. graminearum* PH1 (FgPH1, 2.2.2) gDNA (3.5.3) mit den Primern 4 und 5 amplifiziert und dem Amplifikat dabei Erkennungsstellen für *NotI* und *AscI* hinzugefügt. Das Amplifikat und pJET1.2/gpda wurden *NotI/AscI* verdaut (3.4.5), die 952 bp Bande (Amplifikat) und 5100 bp Bande (pJET1.2/gpda), über ein präparatives Agarosegel isoliert (3.4.3), gereinigt (3.4.7) und ligiert (3.4.10). Die nach Transformation in *E.coli* erhaltenen Kolonien wurden mit den Primern 3 und 5 getestet. Das Plasmid eines positiven Klons mit einem Amplifikat von 975 bp wurde isoliert (pJET1.2/gpda/LF) und sequenziert (**Abbildung 6B**).

Die 1007 bp des downstream des *pks12* Gens liegenden homologen Bereiches aus FgPH1 gDNA wurden mit den Primern 6 und 7 amplifiziert und dabei dem Amplifikat Erkennungsstellen für *XbaI* und *ClaI* hinzugefügt. Das Amplifikat und pJET1.2/gpda/LF wurden mit *XbaI/ClaI* verdaut. Die *XbaI* und *ClaI* Erkennungsstellen sind Teil der *multiple*

ERGEBNISSE

cloning site (mcs) des pJET1.2. Das verdaute PCR-Produkt und die 6050 bp des Plasmids wurden über ein präparatives Agarosegel isoliert und ligiert. Die nach Transformation in *E.coli* erhaltenen Kolonien wurden mit den Primern 6 und 8 auf ein 1030 bp Amplifikat getestet. Das isolierte Plasmid (**pJET1.2/gpdA/LF/RF**) eines positiv getesteten Klons wurde sequenziert (**Abbildung 6C**).

Das nptII-Resistenzgen (807 bp) wurde aus pII99GFP (2.6) mit den Primern 9 und 10 amplifiziert und dabei dem Amplifikat Erkennungsstellen für *SmaI* und *XbaI* hinzugefügt. Das Amplifikat und pJET1.2/gpdA/LF/RF-Plasmid wurden *SmaI/XbaI* verdaut, über ein präparatives Agarosegel isoliert, und ligiert. Die nach Transformation erhaltenen Kolonien wurden mit den Primern 3 und 5 auf ein Amplifikat von 1830 bp getestet. Das isolierte Plasmid (**pΔpks12**) eines positiv getesteten Klons wurde sequenziert (**Abbildung 6D**).

Das pΔpks12 wurde *NotI/ClaI* verdaut, mittels Fällung konzentriert (3.4.8) und in FgPH1 transformiert (3.5.1). Transformanden wurden auf CM(F)_{Gen} (2.3) selektiert. Klone, die in einer PCR mit den Primern 9 und 10 eine 807 bp Bande und keine 500 bp Bande für das *pks12* Gen mit den Primern 11 und 12 (3.5.2) zeigten, wurden mittels Southern Blot (3.5.4) und einer Sonde (1007 bp) - amplifiziert (**Tabelle 16**) von **pΔpks12** mit den Primern 6 und 7 - analysiert. Hierfür wurde gDNA von 7 Transformanden und vom FgPH1 (Wildtyp, WT) als Negativkontrolle (NK) isoliert (2.2.2) und *MluI/NaeI* verdaut. (**Abbildung 7A**). Als Positivkontrolle (PK) diente das *PvuI* linearisierte **pΔpks12**. Es zeigte im Southern Blot eine erwartete Bande bei 6854 bp. Die Transformanden 18 - 21 zeigten eine einzelne Bande und somit eine einzige Integration. Die Bandengröße von 2611 bp zeigte zudem die Integration am Zielort. Die Transformande 15 zeigte eine zusätzliche Bande bei ca. 6000 bp, was auf eine weitere Integration an anderer Position hindeutet, und Transformande 17 zeigte eine Bande bei 9000 bp, was auf die Integration an falscher Position schließen lässt. Transformande 16 zeigte im Southern Blot keine Bande. Somit wurde bei dieser Transformande an keiner Stelle das vollständige Konstrukt integriert. (**Abbildung 7B**). Die Transformande 20 wurde als **FgΔpks12** für alle weiteren Versuche genutzt.

ERGEBNISSE

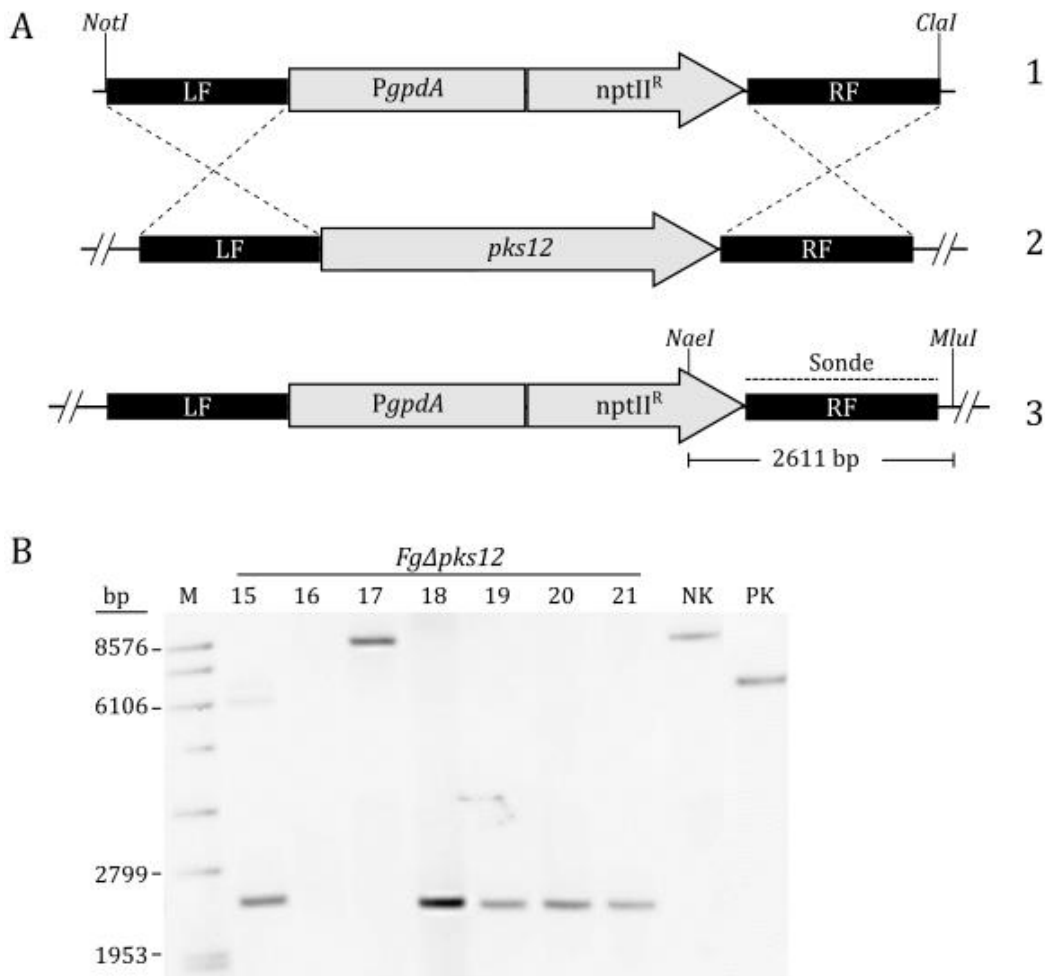


Abbildung 7: Deletionsstrategie und Southern Blot zum Nachweis der korrekten Integration des $p\Delta pks12$ in FgPH1 ($Fg\Delta pks12$). (A) Deletions- und Hybridisierungsstrategie. Die Deletion des *pks12* Gens (2) wird durch den Austausch mit dem *NotI/ClaI* linearisierten $p\Delta pks12$ (1) über homologe Rekombination erreicht. In (3) ist der Genotyp des resultierenden Stammes nach Transformation in die FgPH1 dargestellt. Der homologe Bereich der Sonde ist mit gestrichelten Linien dargestellt. (B) Southern Blot Analyse der Transformanten und des FgPH1 WT nach *NaeI/MluI* Verdau. Verwendet wurde eine für den Integrationsort spezifische Sonde im Bereich der Rechten Flanke (RF). M: DNA Molecular Weight Marker VII (Roche, Penzberg, Deutschland); 15-21: getestete Transformanten; NK: gDNA FgPH1; PK: *PvuI* linearisiertes $p\Delta pks12$. Transformanten (18-21) zeigten bei richtiger Integration eine Bande bei 2611 bp und der Wildtyp bei 9256 bp. Die Transformante 20 wurde als **$Fg\Delta pks12$** für alle weiteren Versuche genutzt.

4.2.2 Herstellung der *hex-1* Deletionsmutane $Fg\Delta hex-1$

Um das *hex-1* Gen im $Fg\Delta pks12$ (4.2.1) zu deletieren, wurde ein Konstrukt $p\Delta hex-1$ verwendet, welches das *hex-1* Gen mit dem selektierbaren Hyg^R Resistenzgen unter der Kontrolle des *PgdpI* Promoters über homologe Rekombination flankierende Bereiche ersetzt. Hierzu war die Hygromycin B (HygB) Resistenzkassette mit den *upstream* und *downstream* Bereichen des *hex-1* Gens fusioniert, so dass über homologe Rekombination

ERGEBNISSE

die Integration des Konstruktes am Zielort im Genom möglich ist (**Abbildung 8**). Das Plasmid war bereits vorhanden (2.6).

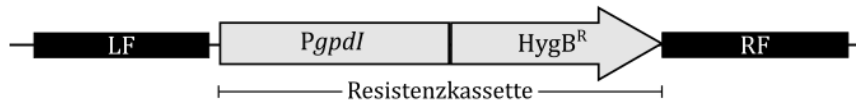


Abbildung 8: Schematische Darstellung des $p\Delta hex-1$

Die HygB Resistenzkassette und die flankierenden Bereiche des *hex-1* Gens wurden aus **pR246_elf5A-k0** (2.6) mittels der Primer 13 und 14 (**Abbildung 9, A1, schwarze Dreiecke**) amplifiziert, gereinigt und in **Fg $\Delta pks12$** transformiert. Positive Transformanden wurden auf CM(F)_{HygB} (2.3) selektiert. Klone, die eine 453 bp Bande mit dem Primerpaar 15 und 16 und keine 1511 bp Bande für das *hex-1* Gen mit dem Primerpaar 17 und 18 zeigten, wurden mittels Southern Blot und einer Sonde (430 bp) - amplifiziert von **pR246_elf5A-ko** mit den Primern 19 und 20 - analysiert. Hierfür wurde gDNA von 5 Transformanden und von Fg $\Delta pks12$ als Negativkontrolle isoliert und *EcoRV/XhoI* verdaut (**Abbildung 9A**). Als Positivkontrolle diente das Amplifikat des $\Delta hex-1$ Konstruktes. Es zeigte die erwartete Bande bei 3873 bp. Die Transformanden 5, 21, 22 und 27 zeigten eine einzelne Bande und somit eine einzige Integration. Die Bandengröße von 1681 bp zeigte zudem die Integration am Zielort. Die Transformande 2 zeigte zwei Banden bei ca. 2800 bp und ca. 5800 bp, was auf zwei Integrationen an anderen Positionen im Genom hindeutet. Die Negativkontrolle zeigte eine erwartete Bande bei 5537 bp (**Abbildung 9B**). Die Transformanden 5 und 27 werden im Folgenden als **Fg $\Delta hex-1^A$** und **Fg $\Delta hex-1^B$** bezeichnet und für alle weiteren Versuche genutzt.

ERGEBNISSE

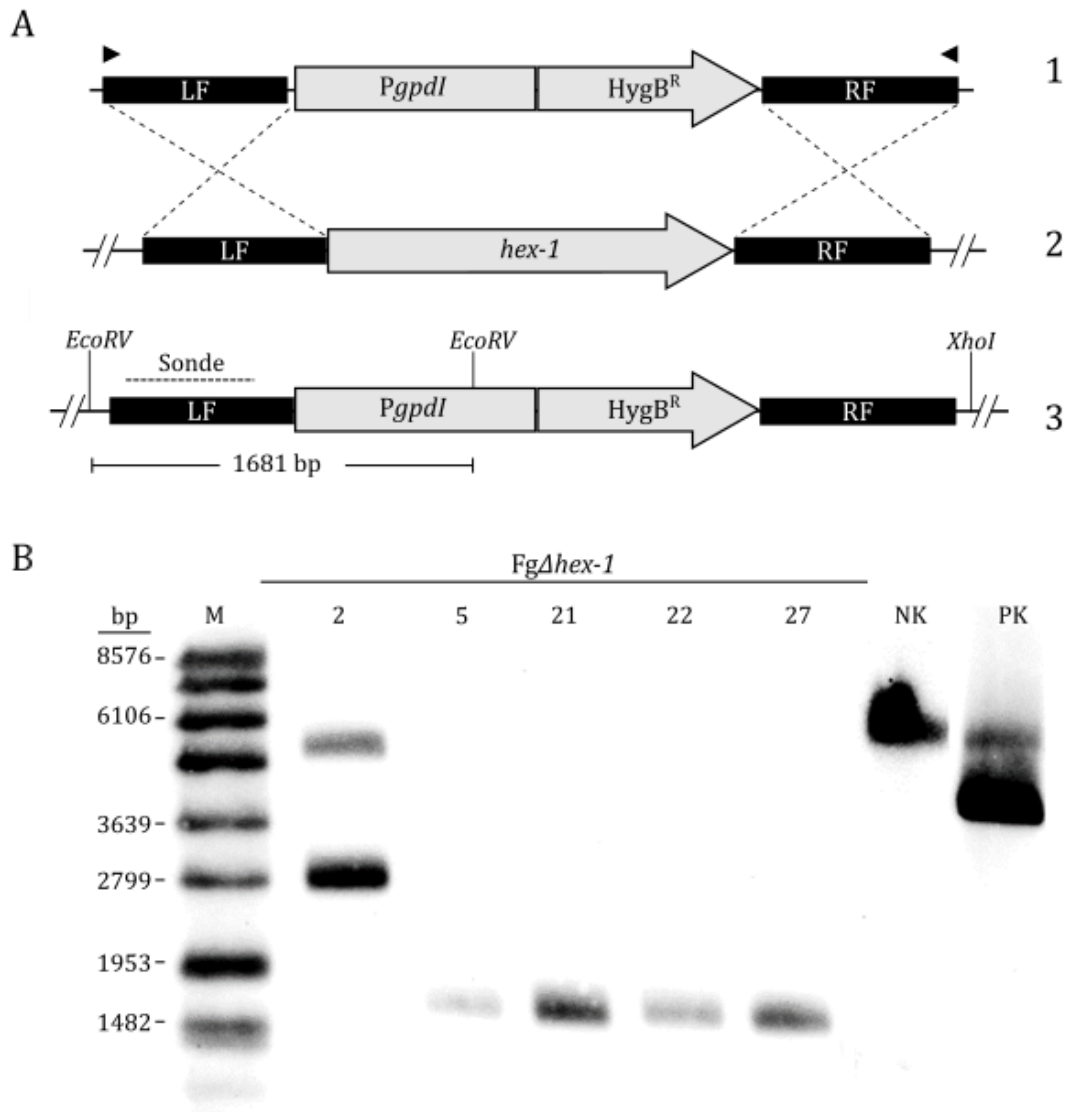


Abbildung 9: Deletionsstrategie und Southern Blot zum Nachweis der korrekten Integration des $\Delta hex-1$ in $Fg\Delta pks12$. (A) Deletions- und Hybridisierungsstrategie des *hex-1* Gens. Die Amplifikation des *hex-1* erfolgte mit den Primern 13 und 14 vom Plasmid pR246_eIF5A-ko (schwarze Dreiecke). Das *hex-1* Gen (2) wurde mit der *HygB* Resistenzkassette (1) über homologe Rekombination ausgetauscht. In (3) ist der Genotyp des resultierenden Stammes nach Transformation in die *FgΔpks12* Mutante dargestellt. (B) Southern Blot Analyse der Transformanten und *FgΔpks12* als Negativkontrolle nach *EcoRV/XhoI* Verdau. Verwendet wurde eine für den Integrationsort spezifische Sonde im Bereich der Linken Flanke (LF). M: DNA Molecular Weight Marker VII (Roche, Penzberg, Deutschland); 2, 5, 21, 22, 27: getestete Transformanten; NK: gDNA *FgΔpks12*; PK: *Δhex-1* 3873 bp Amplifikat. Transformanten (5, 21, 22, 27) zeigten bei richtiger Integration eine Bande bei 1681 bp und der *FgΔpks12* (NK) bei 5537 bp. Die Transformanten 5 und 27 werden im Folgenden als **FgΔhex-1^A** und **FgΔhex-1^B** bezeichnet und für alle weiteren Versuche genutzt.

4.2.3 Herstellung der so Deletionsmutante $Fg\Delta so$

Um das *so* Gen im **FgΔpks12** (4.2.1) zu deletieren, wurde das Konstrukt **pΔso** erstellt, welches das Nourseothricin N-acetyl transferase (*Nat^R*) Gen unter der Kontrolle des *PoliC* Promoters (= *Nat^R* Resistenzkassette) und flankierende Bereiche, die zum Integrationsort

ERGEBNISSE

homolog sind, beinhaltet. Hierzu wurde die NAT Resistenzkassette mit den Bereichen *upstream* und *downstream* des *so* Gens fusioniert. (**Abbildung 10**).

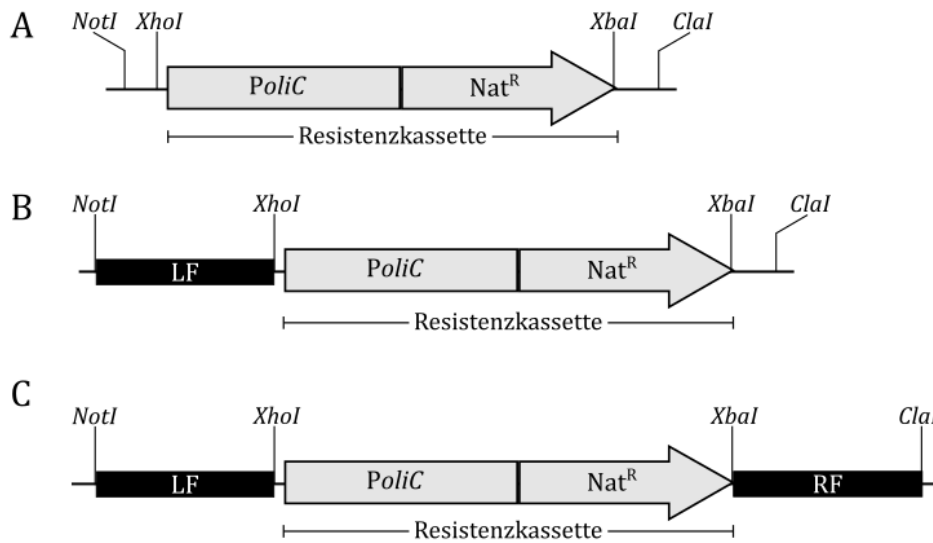


Abbildung 10: Klonierungsstrategie des pΔso. (A) Amplifikation und Ligation der Nourseothricin (Nat^R) Resistenzkassette in pJET1.2 (**pJET1.2/Nat**). (B) *XhoI/NotI* Fusion des *upstream*-Bereiches (LF) des *so* Gens mit pJET1.2/Nat (**pJET1.2/Nat/so LF**). (C) *XbaI/ClaI* Fusion des *downstream*-Bereiches (RF) des *so* Gens mit pJET1.2/Nat/so up (**pΔso**).

Die Amplifikation der Nourseothricin Resistenzkassette (1414 bp) erfolgte aus dem pSilent-1_{NAT} (2.6) mittels der Primer 21 und 22. Dabei wurde eine *XbaI* Schnittstelle generiert. Ein µl des PCR-Produktes wurde in pJET1.2 ligiert. Nach der Transformation des Ligationsansatzes in *E.coli* wurden die Kolonien mit den Primern 3 und 23 auf Integration und Orientierung des Inserts kontrolliert. Positive Klone mit einer Integration in 5'-3' Orientierung wiesen ein Amplifikat von 921 bp auf. Das Plasmid (**pJET1.2/Nat**) eines positiv getesteten Klons wurde isoliert und sequenziert (**Abbildung 10A**).

Die Amplifikation von 966 bp des *upstream* vom *so* Gen liegenden homologen Bereiches (Linke Flanke, LF) wurde aus FgPH1 gDNA mittels der Primer 24 und 25 amplifiziert und dabei dem Amplifikat Schnittstellen für *NotI* und *XhoI* hinzugefügt. Das PCR Produkt und das Plasmid pJET1.2/Nat wurden *NotI/XhoI* verdaut. *NotI* und *XhoI* sind Restriktionserkennungstellen der *multiple cloning site* (mcs) des pJET1.2 Vektors. Verdautes PCR-Produkt und Plasmid wurden über ein präparatives Agarosegel isoliert, gereinigt und ligiert. Die nach Transformation in *E.coli* gewachsenen Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR mit den Primern 3 und 25 getestet. Positive Klone wiesen ein Amplifikat von 981 bp auf. Das isolierte Plasmid (**pJET1.2/Nat/so LF**) eines positiv getesteten Klons wurde sequenziert (**Abbildung 10B**).

ERGEBNISSE

Ein 1020 bp großer Bereich *downstream* des *so* Gens (rechte Flanke, RF) wurde aus FgPH1 gDNA mittels der Primer 26 und 27 amplifiziert und dabei dem Amplifikat Schnittstellen für *XbaI* und *Clal* hinzugefügt. Das Amplifikat und pJET1.2/Nat/*so* up wurden *XbaI/Clal* verdaut. Die *Clal* Erkennungsstelle im pJET1.2/Nat/*so* up befindet sich in der *mcs* des Vektors. Das verdaute PCR-Produkt und Plasmid wurden anschließend über ein Agarosegel isoliert, gereinigt, ligiert und in *E.coli* transformiert. Die Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR mit den Primern 8 und 26 getestet. Positive Klone wiesen ein Amplifikat von 1042 bp auf. Das Plasmid (**pJET1.2/Nat/*so* LF/*so* RF**) eines positiv getesteten Klons wurde isoliert, sequenziert und **pΔ*so*** genannt (**Abbildung 10C**).

Das pΔ*so* wurde *NotI/Clal* verdaut, konzentriert und in *FgΔpks12* transformiert. Transformanden wurden auf CM(F)_{NAT} (2.3) selektiert. Transformanden, die eine 592 bp Bande mit den Primern 22 und 28 und keine 1760 bp Bande für das *so* Gen mit den Primern 29 und 30 zeigten, wurden mittels Southern Blot analysiert. Hierfür wurde gDNA von 10 Transformanden und *FgΔpks12* als Negativkontrolle isoliert, *XbaI/EcoRI* verdaut und mit einer Sonde mit einer Größe von 1020 bp - amplifiziert von pΔ*so* mit den Primern 26 und 27- analysiert. Bei korrekter Integration wurde eine einzelne Bande bei 1766 bp erwartet (**Abbildung 11A**). Als Positivkontrolle diente das *PvuI* linearisierte pΔ*so*. Es zeigte die erwartete Bande bei 6308 bp. Die Negativkontrolle zeigte die erwartete Bande bei 6522 bp und zwei weitere schwache Banden zwischen 1900 bp und 2500 bp. Die Transformanden 2, 3 und 5 zeigten teilweise multiple Banden mit verschiedenen Größen, was darauf hindeutet, dass das Konstrukt an anderen Integrationsorten im Genom mehrfach integriert worden war. Die Transformanden 1, 4, 14 und 15 zeigten neben der Bande bei 1766 bp auch eine zusätzliche leichte Bande bei ca. 3600 bp und teilweise bei ca. 2500 bp. Bei diesen Transformanden war neben der korrekten Integration eine weitere Integration an einem weiteren Integrationsort wahrscheinlich. Die Transformanden 8 und 9 zeigten eine klare Bande bei 1766 bp, was auf die korrekte Integration des Konstrukts hindeutet und eine weitere schwache Bande bei ca. 2500 bp. Da diese Bande auch in der Negativkontrolle detektiert wurde, ist davon auszugehen, dass es sich um eine unspezifische Bindung der Sonde handelt (**Abbildung 11B**). Die Transformanden 8 und 9 wurden daher ausgewählt, als **FGΔ*so*^A** und **FGΔ*so*^B** bezeichnet und für alle weiteren Versuche genutzt.

ERGEBNISSE

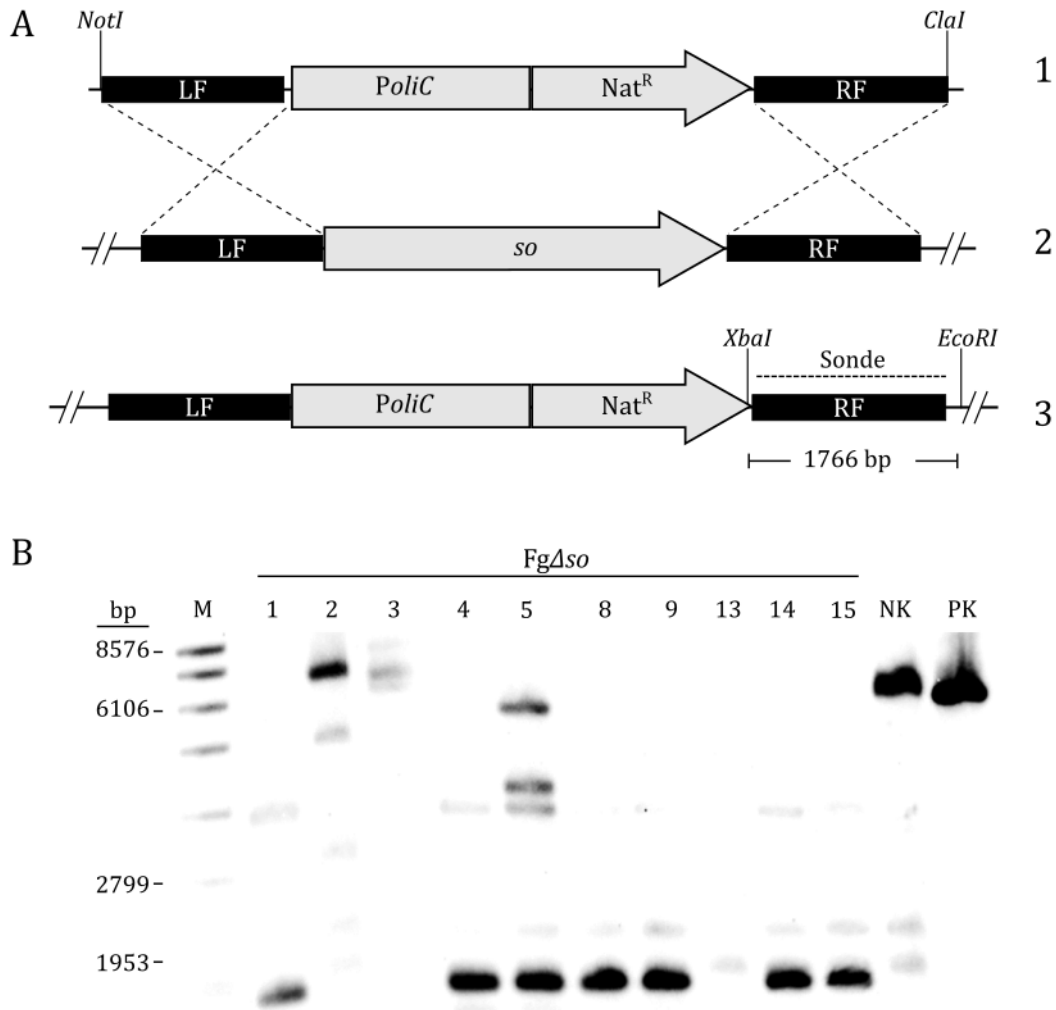


Abbildung 11: Deletionsstrategie und Southern Blot zum Nachweis der korrekten Integration des p Δ so in $Fg\Delta pks12$. (A) Deletions- und Hybridisierungsstrategie des *so* Gens. Die Deletion des *so* Gens (2) wird durch den Austausch mit dem *NotI/ClaI* linearisierten p Δ so über homologe Rekombination erreicht (1). In (3) ist der Genotyp des resultierenden Stammes nach Transformation in die $Fg\Delta pks12$ Mutante dargestellt. (B) Southern Blot Analyse der Transformanten und $Fg\Delta pks12$ als Negativkontrolle nach *XbaI/EcoRI* Verdau. Verwendet wurde eine für den Integrationsort spezifische Sonde im Bereich der Rechten Flanke (RF). M: DNA Molecular Weight Marker VII (Roche, Penzberg, Deutschland); 1-5, 8, 9, 13-15: Getestete Transformanten; NK: $Fg\Delta pks12$; PK: *PvuI* linearisiertes p Δ so. Transformanten (8,9) zeigten bei richtiger Integration eine Bande bei 1766 bp und der $Fg\Delta pks12$ (NK) bei 6522 bp. Die Transformanten 8 und 9 wurden daher ausgewählt, als **$Fg\Delta so^A$** und **$Fg\Delta so^B$** bezeichnet und für alle weiteren Versuche genutzt.

4.2.4 Herstellung der *hex-1/so* Deletionsmutante $Fg\Delta hex-1/\Delta so$

Um beide Gene, *so* und *hex-1*, in einer Mutante zu deletieren wurde das p Δ so (4.2.3) *NotI/ClaI* verdaut, mittels Fällung konzentriert und in $FgPH1 Fg\Delta hex-1^A$ (4.2.2) transformiert. Positive Transformanten wurden analog zu den $Fg\Delta so$ Transformanten analysiert (4.2.3). Für die Southern Blot Analyse wurde gDNA von 7 Transformanten und

ERGEBNISSE

FgΔhex-1^A als Negativkontrolle isoliert und *XbaI/EcoRI* verdaut. Es wurde die gleiche Sonde wie für die Untersuchung der *FgΔso* Transformanden (4.2.3) verwendet. Bei korrekter Integration wurde eine einzelne Bande bei 1766 bp erwartet. Als Positivkontrolle diente das *XbaI/EcoRI* verdaute *pΔso*. Es zeigte eine erwartete Bande bei 3401 bp und zusätzlich eine Bande bei 6308 bp, was auf einen unvollständigen Verdau des Plasmids deutet. Die Transformanden 1, 5, 9 und 16 zeigten die erwartete Bande bei 1766 bp und zusätzlich eine schwache Bande bei ca. 3500 bp, was auf eine zweite Integration deutet. Die Transformanden 7 und 12 zeigten eine einzelne Bande bei 1766 bp, was auf die korrekte Integration des Konstrukts schließen lässt. Die Transformande 4 zeigte wie die Negativkontrolle eine Bande bei 6522 bp und weist damit keine Integration des *pΔso* auf (**Abbildung 12**). Die Transformanden 7 und 12 wurden ausgewählt, als ***FgΔhex-1/Δso^A*** und ***FgΔhex-1/Δso^B*** bezeichnet und für alle weiteren Versuche genutzt.

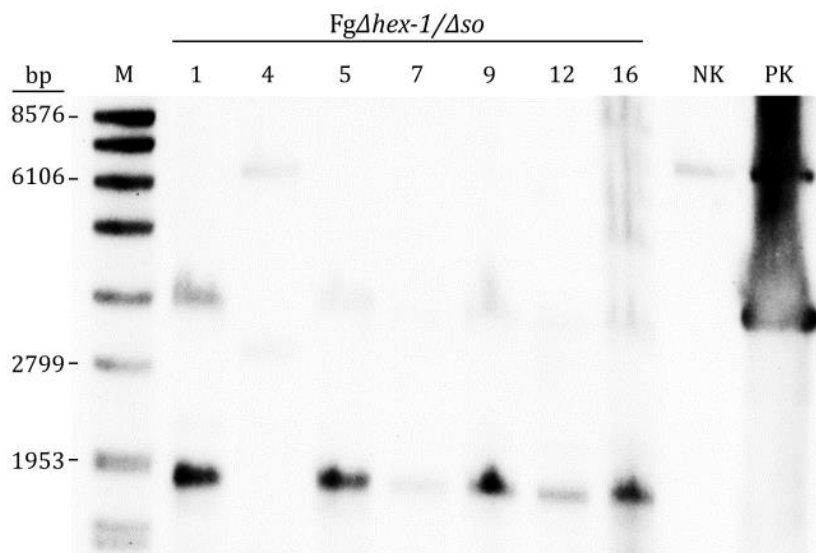


Abbildung 12: Southern Blot Analyse zum Nachweis *pΔso* in *FgΔhex-1* Die korrekte Integration wurde wie in (4.2.3) beschrieben nachgewiesen. M: DNA Molecular Weight Marker VII (Roche, Penzberg, Deutschland); 1, 4, 5, 7, 9, 12, 16: Getestete Transformanden; NK: *FgΔhex-1*; PK: *XbaI/EcoRI* verdautes *pΔso*. Transformanden (7,12) zeigten bei korrekter Integration eine Bande bei 1766 bp und der *FgΔhex-1* (NK) bei 6522 bp. Die Transformanden 7 und 12 wurden ausgewählt, als ***FgΔhex-1/Δso^A*** und ***FgΔhex-1/Δso^B*** bezeichnet und für alle weiteren Versuche genutzt.

4.2.5 Herstellung der GFP-markierten *hex-1* Überexpressionsmutante *Fg_{OE}hex-1*

Zur Erstellung der *hex-1* Überexpressionsmutante *Fg_{OE}hex-1/GFP* wurde der für das *hex-1* Protein kodierende Bereich von *FgPH1* cDNA amplifiziert, über einen GS-Linker (*GGA GGT GGA GGA TCC*, (G₄S)_n-Linker; (Chen *et al.*, 2013), mit eGFP fusioniert und zur

ERGEBNISSE

Fusion des *PTrpC* Promoters in pSilent-1_{NAT} kloniert. Flankierende Bereiche zur HygB-Resistenzkassette wurden über die Klonierung in pGEM-T HygB (2.6) zugefügt (**p_{oe}hex-1/GFP**). Diese flankierenden Bereiche erlauben über homologe Rekombination die gerichtete Integration in den Bereich der Deletion des *hex-1* Gens von *FgΔhex-1* (**Abbildung 13**). Die Transformation erfolgte in *FgΔhex-1^A* (4.2.2).

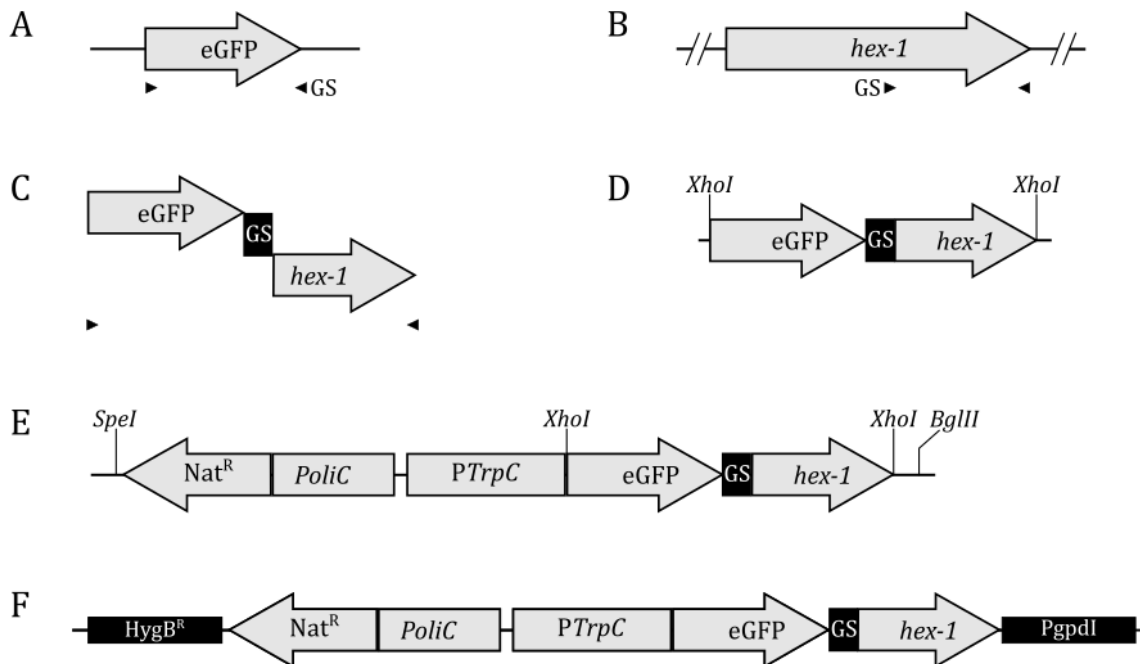


Abbildung 13: Klonierungsstrategie p_{oe}hex-1/GFP. (A) Amplifikation von eGFP mit einem modifizierten *reverse* Primer, der die Sequenz für den GS-Linker beinhalten. (B) Amplifikation der Protein-kodierenden Region des *hex-1* Gens von *FgPH1* cDNA. Der *forward* Primer beinhaltet die Sequenz für den GS-Linker. (C) Overlap extension PCR der Amplifikate A und B mit Primern, die Erkennungsstellen für *XhoI* beinhalten. (D) Klonierung des eGFP-GS-*hex-1* Amplifikats in pJET1.2 (**pJET1.2/eGFP-hex-1**). (E) Umklonierung des pJET1.2/eGFP-*hex-1* über *XhoI* Schnittstellen in pSilent-1_{Nat} (**pSilent-1_{Nat}/eGFP-hex-1**) (F) Umklonierung des pSilent-1_{Nat}/eGFP-*hex-1* in pGEM-T HygB über *SpeI* und *BglII* Schnittstellen (**p_{oe}hex-1/GFP**).

Das eGFP Gen (738 bp) wurde von pII99GFP (2.6) mit den Primern 31 und 32 amplifiziert (**Abbildung 13A**). Ein 567 bp Fragment des *hex-1* Gens wurde von cDNA (3.4.2) mit den Primern 18 und 33 amplifiziert (**Abbildung 13B**). Die Primer wurden so entworfen, dass eine Sequenzüberlappung der beiden Amplifikate entstand. Mittels *overlap extension* PCR (3.4.1) und den Primern 18 und 31 wurde das eGFP-GS-*hex-1* Amplifikat mit einer Größe von 1299 bp generiert (**Abbildung 13C**), und dem Amplifikat *XhoI* Schnittstellen hinzugefügt. Das PCR-Produkt wurde in den pJET1.2/blunt ligiert (**Abbildung 13D**) und in *E. coli* transformiert. Mit den Primern 3 und 8 wurden positive Klone mit einem ein Amplifikat von 1381 bp detektiert. Das Plasmid eines positiven Klones (**pJET1.2/eGFP-hex-1**) wurde isoliert, sequenziert und *XhoI* verdaut. Der Vektor

ERGEBNISSE

pSilent-1_{NAT} wurde *XhoI* linearisiert. Die 6580 bp des Vektors und die 1292 bp Bande des eGFP-*hex-1* wurden über ein präparatives Agarosegel isoliert, gereinigt und ligiert (**Abbildung 13E**). Die nach Transformation erhaltenen Kolonien wurden den Primern 34 und 35 getestet. Positive Klone mit einer Integration in 5'-3' Orientierung wiesen ein Amplifikat von 1382 bp auf. Das Plasmid eines positiven Klons (**pSilent-1_{NAT}/eGFP-*hex-1***) wurde isoliert und sequenziert.

Um flankierende Bereiche für die homologe Rekombination zu generieren, wurden Teile des pSilent-1_{NAT}/eGFP-*hex-1* in pGEM-T HygB integriert. Hierzu wurde das Plasmid *SpeI* linearisiert und die Enden geglättet (3.4.6). Anschließend wurde das linearisierte Plasmid *BglII* verdaut. Das Plasmid des pGEM-T HygB Vektors wurde mit *EcoRV* und *BglII* verdaut. Die 5427 bp Bande des pSilent-1_{NAT}/eGFP-*hex-1* und die 4561 bp Bande des pGEM-T HygB wurden über ein präparatives Agarosegel isoliert, gereinigt, ligiert (**Abbildung 13F**) und in *E.coli* transformiert. Die erhaltenen Kolonien wurden mit den Primern 16 und 21 getestet. Positive Klone wiesen ein Amplifikat von 2376 bp auf (**p_{OE}*hex-1*/GFP**). Das Plasmid von p_{OE}*hex-1*/GFP wurde isoliert und sequenziert.

Das p_{OE}*hex-1*/GFP wurde *ApaI/NsiI* verdaut, konzentriert und in *FgΔhex-1^A* (4.2.2) transformiert. Positive Transformanten wurden auf CM(F)_{NAT} (2.3) selektiert. Transformanten, die eine 592 bp Bande mit den Primern 22 und 28 und keine und keine 453 bp Bande für die HygromycinB-Resistenzkassette mit den Primern 15 und 16 zeigten, wurden mittels Southern Blot analysiert. Hierfür wurde gDNA von 7 Transformanten, *FgΔhex-1^A* und *FgΔpks12* als Negativkontrollen isoliert und *NcoI* verdaut. Eine DIG-markierte Sonde (430 bp) – erstellt mit den Primern 19 und 20 – zeigte bei korrekter Integration eine einzelne Bande bei 6652 bp (**Abbildung 14A**). Als Positivkontrolle diente das mit *ApaI/NsiI* verdaute Überexpressionskonstrukt p_{OE}*hex-1*/GFP. Es zeigte die erwartete Bande bei 6001 bp. Die beiden Negativkontrollen *FgΔhex-1A* (NK1) zeigte die erwartete Bande bei 2422 bp, *FgΔpks12* (NK2) zeigte die erwartete Bande bei 1261bp. Die Transformanten 9-11 und 13-14 zeigten eine einzelne Bande bei ca. 2422 bp und somit eine einzige Integration wie NK1. Bei diesen Transformanten ist das p_{OE}*hex-1*/GFP nicht integriert. Die Transformanten 12 und 15 zeigten eine einzelne Bande bei etwa 6652 bp, was auf die Integration am Zielort hindeutet. Die Transformanten 12 und 15 (**Fg_{OE}*hex-1*/GFP^A** und **Fg_{OE}*hex-1*/GFP^B**) wurden für alle weiteren Versuche genutzt.

ERGEBNISSE

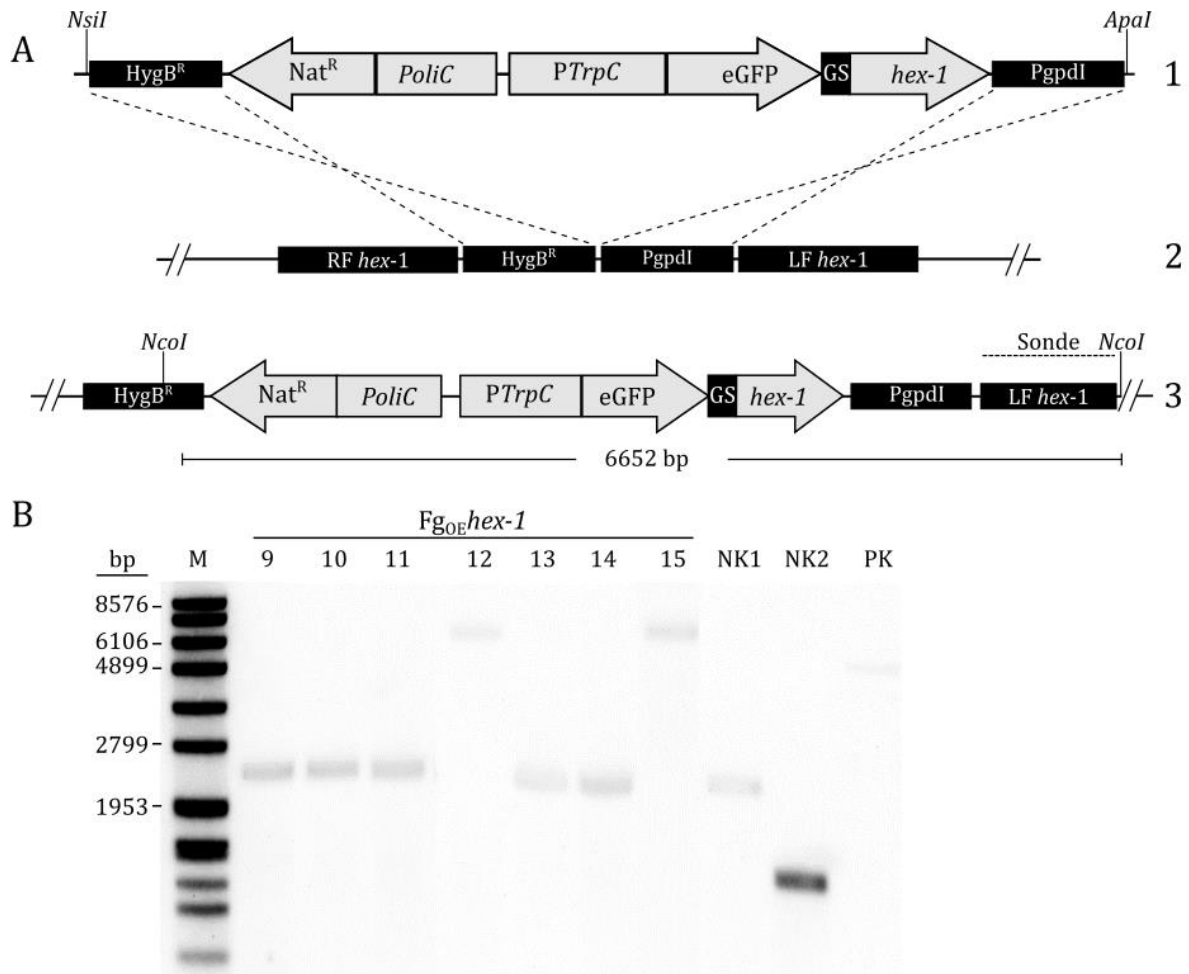


Abbildung 14: Austauschstrategie und Southern Blot zum Nachweis der Integration des *pOEhex-1/GFP* in *FgΔhex-1^A* (A) Austausch- und Hybridisierungsstrategie von *pOEhex-1/GFP*. Integration der *NsiI/Apal* linearisierten *pOEhex-1/GFP* Expressionskassette (1) durch homologe Rekombination in den Bereich von *pΔhex-1* (2). In (3) ist der Genotyp des transformierten *FgΔhex-1^A* Stammes dargestellt. Der Bereich, der als Sonde für den Southern Blot diente ist mit gestrichelten Linien dargestellt. (B) Southern Blot Analyse der Transformanten, *FgΔhex-1^A* (NK1) und *FgΔpks1* (NK2) als Negativkontrollen. Die DNA der Transformanten und Negativkontrollen wurde *NcoI* verdaut. Detektiert wurde eine Sonde homolog zur *LFhex-1* M: DNA Molecular Weight Marker VII (Roche, Penzberg, Deutschland); 9-15: getestete Transformanten; NK1: gDNA *FgΔhex-1A*; NK2: gDNA *FgΔpks12*; PK: *Apal/NsiI* verdautes *pOEhex-1/GFP*. Transformanten zeigten bei richtiger Integration eine Bande bei 6652 bp und die Negativkontrollen bei 2422 bp (NK1) und 1261 bp (NK2). Die Transformanten 12 und 15 werden im Folgenden als ***FgOEhex-1^A*** und ***FgOEhex-1^B*** bezeichnet und für alle weiteren Versuche genutzt.

Zur Überprüfung der mRNA Transkriptionslevel von Hex-1 wurde Myzel der Mutanten ***FgOEhex-1^A*** und ***FgOEhex-1^B*** und als Kontrolle FgPH1 in Flüssigkultur (3.1.2) über 3 Tage angezogen. Die gesamte RNA der Proben wurde extrahiert, in cDNA umgeschrieben (3.4.2) und mittels qPCR (3.5.7) analysiert. Amplifiziert wurde ein 210 bp Fragment von *hex-1* und ein 200 bp Fragment des Haushaltgens β -Tubulin (2.5). Die Analyse erfolgte mit je drei biologischen und drei technischen Replikaten. Die statistische Auswertung (3.8)

ERGEBNISSE

erfolgte unter Anwendung einer einfaktoriellen ANOVA und paarweisen t-Tests mit Bonferroni-Korrektur. Die auf β -Tubulin normalisierten Transkriptionslevel von Hex-1 in FgPH1 und den Überexpressionsmutanten **Fg_{OE}hex-1** zeigten signifikante Unterschiede (**Abbildung 15**). Die Expression von Hex-1 in **Fg_{OE}hex-1** stieg auf $2^{\Delta\Delta CT}=4.9$ und ist im Verhältnis zu Hex-1 in FgPH1 ($2^{\Delta\Delta CT}=1$) um durchschnittlich 390% erhöht.

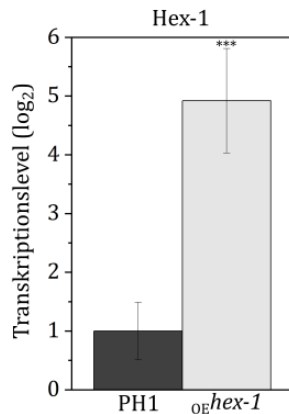


Abbildung 15: Analyse der auf β -Tubulin normalisierten Transkriptionslevel von Hex-1 mittels qPCR in FgPH1 (PH1) und Fg_{OE}hex-1. Es wurde der $\Delta\Delta CT$ -Wert ermittelt und das Expressionsverhältnis als $2^{-\Delta\Delta CT}$ angegeben. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes an. Signifikanzlevel sind wie folgt angegeben: $p < 0.001$ '***'.

4.2.6 Herstellung der regulierbaren mCherry markierten *so*

Überexpressionsmutante Fg_{so}

Mit der Mutante **Fg_{OE}so/mCherry** ist es möglich, über Kupfer die Expression des *so* Gens zu regulieren. Für die Erstellung des Konstruktes **p_{OE}so/mCherry**, wurde das für das SO Protein kodierende Gen mit dem mCherry Reportergen fusioniert, und in pBJ-1 (2.6) kloniert. Im pBJ-1 werden Gene unter der Kontrolle des Fg*Tcu-1* Promoters (1500 bp *upstream* von ORF XP_011324683.1) exprimiert, wodurch die Expression regulierbar ist (**Abbildung 16**).

ERGEBNISSE

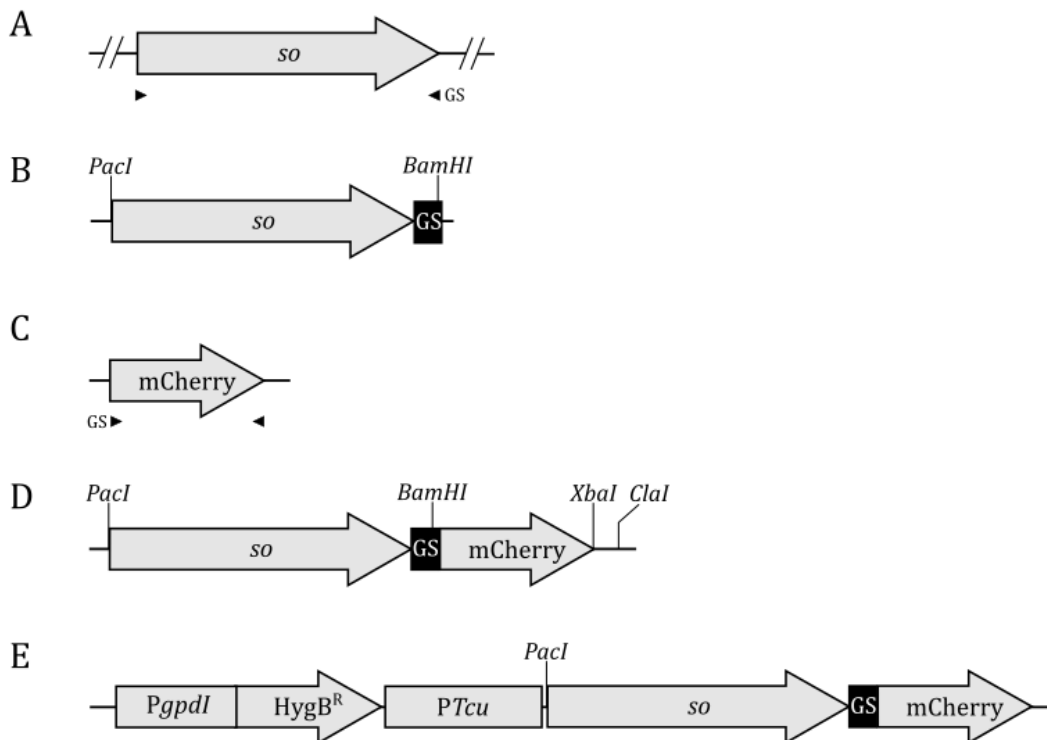


Abbildung 16: Klonierungsstrategie des p_{OE}so/mCherry (A) Amplifikation des für das SO Protein kodierenden Gens. (B) Ligation des Amplifikats in pJET1.2/blunt (**pJET1.2/so**) (C) Fusion des mCherry mit dem GS-Linker über PCR (**GS-mCherry**). (D) *BamHI/XbaI* Fusion des GS-mCherry in pJET1.2/so (**pJET1.2/so-mCherry**). (E) Klonierung des pJET1.2/so-mCherry in pBJ (**p_{OE}so/mCherry**).

Das 3715 bp große Fragment des *so* Gens wurde von FgPH1 gDNA mit den Primern 36 und 37 (**Abbildung 16A**) amplifiziert und dabei Schnittstellen für *PaclI* und *BamHI* hinzugefügt. 1 µl des Amplifikats wurde in pJET1.2/blunt ligiert. Nach der Transformation in *E.coli* wurden mit den Primern Primer 3 und 30 positive Klone mit einem ein Amplifikat von 2775 bp detektiert. Das Plasmid eines positiv getesteten Klons (**pJET1.2/so**) wurde isoliert und sequenziert (**Abbildung 16B**).

Das mCherry Gen (729 bp) wurde von pPP81 (2.6) mit den Primern 38 und 39 amplifiziert und über den *forward* Primer dem Amplifikat ein GS-linker Sequenz (GGA GGT GGA **GGA TCC**) mit integrierter *BamHI* Schnittstelle hinzugefügt. Mittels des *reverse* Primers wurde dem Amplifikat eine *XbaI* Erkennungsstelle hinzugefügt (**Abbildung 16C**).

Das Amplifikat und Rückgrat pJET1.2/so wurden nach *BamHI/XbaI* Verdau über ein präparatives Agarosegel isoliert, gereinigt und ligiert. Die resultierenden Kolonien der Transformation in *E. coli* wurden mittels Kolonie-PCR mit den Primern 38 und 40 getestet. Das Plasmid eines positiven Klons (**pJET1.2/so-mCherry**) mit einem Amplifikat von 781 bp wurde isoliert und sequenziert (**Abbildung 16D**).

ERGEBNISSE

Für die Klonierung des *so*-mCherry in den pBJ-1 wurde das pJET1.2/*so*-mCherry *Clal* und das pBJ-1 *BamHI* linearisiert und die Enden geglättet. (3.4.6). Beide Plasmide wurden *PacI* verdaut. Die 6198 bp Bande aus pBJ-1 und die 4441 bp Bande aus pJET1.2/*so*-mCherry wurden über ein präparatives Agarosegel isoliert, gereinigt und ligiert. Die nach Transformation in *E. coli* gewachsenen Kolonien wurden mit den Primern 14 und 38 getestet. Das Plasmid von einem positiven Klon (**po_{ESO}/mCherry**), mit einem Amplifikat von 839 bp wurde isoliert und sequenziert (**Abbildung 16E**).

Das po_{ESO}/mCherry wurde *PsiI* linearisiert, konzentriert und in FgΔ*so*^A (4.2.3) transformiert. Positive Transformanden wurden auf CM(F)_{HygB} (2.3) selektiert. Transformanden, die eine 729 bp Bande mit den Primern 38 und 39 aufwiesen, wurden mittels Southern Blot analysiert. Hierfür wurde gDNA von 12 Transformanden *XhoI* verdaut. Eine DIG-markierte Sonde, homolog zu der mCherry Sequenz mit einer Größe von 729 bp wurde mit den Primern 38 und 39 erstellt (Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**A**). Als Positivkontrolle diente das *PsiI* linearisierte po_{ESO}/mCherry. Es zeigte eine erwartete Bande bei 10647 bp. Die Integration von po_{ESO}/mCherry erfolgte nicht über homologe Rekombination an einen bestimmten Integrationsort, sondern als linearisiertes Überexpressionskonstrukt an einen zufälligen Integrationsort. Eine Negativkontrolle ist in diesem Fall nicht notwendig. Die Transformanden 1-4 und 6-12 zeigten eine einzelne Bande bei ca. 10000 bp und somit eine einzige Integration des Konstruktes in das Genom. Die Transformande 5 zeigte eine Bande bei ca. 10000 bp und eine weitere Bande bei ca. 6000 bp. Dies deutet darauf hin, dass das Konstrukt zwei Mal ins Genom integriert wurde (Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**B**). Die Transformanden 7, 10 und 12 (**Fgso^A**, **Fgso^B** und **Fgso^C**) wurden für alle weiteren Versuche genutzt.

ERGEBNISSE

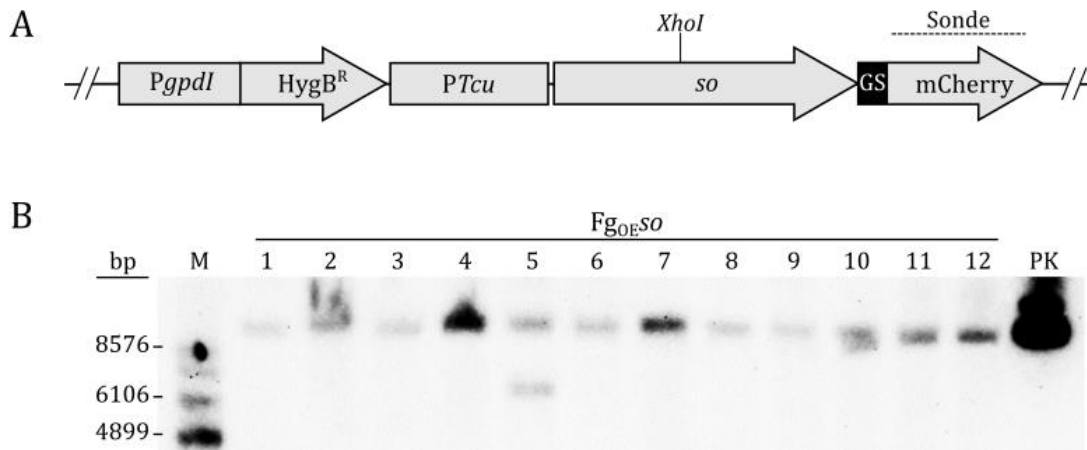


Abbildung 17: Fgso und Southern Blot Strategie zum Nachweis der Integration in FgΔso^A. (A) Genotyp des mit dem *p_{OESO}/mCherry* transformierten *FgΔso^A* (*Fgso*). Der Bereich, der als Sonde für den Southern Blot diente ist mit gestrichelten Linien dargestellt. (B) Southern Blot von *XhoI* verdauter gDNA der Transformanden M: DNA Molecular Weight Marker VII (Roche, Penzberg, Deutschland); 1-12: getestete Transformanden; PK: *PsiI* verdautes *p_{OESO}/mCherry* zeigte die erwartete Bande bei 10647. Die Transformanden zeigten bei Integration (1-4, 5-12) eine einzelne Bande unbekannter Größe, Transformande 5 zeigte eine zweite Integration. Die Transformanden 7, 10 und 12 (**Fgso^A**, **Fgso^B** und **Fgso^C**) wurden für alle weiteren Versuche genutzt.

Zur Überprüfung der Expression von SO in den regulierbaren mCherry markierten SO Expressionsmutanten wurden die mRNA Transkriptionslevel von SO unter reprimierenden und überexprimierenden Bedingungen analysiert. Myzel der Mutanten mit reprimiertem und aktivem Promoter und als Kontrolle FgPH1 wurde in Flüssigkultur (3.1.2) über 3 Tage angezogen. Die gesamte RNA der Proben wurde extrahiert, in cDNA umgeschrieben (3.4.2) und mittels qPCR (3.5.7) analysiert. Amplifiziert wurde ein 230 bp Fragment von *so* und ein 200 bp Fragment des Haushaltsgens β -Tubulin (2.5). Die Analyse erfolgte mit je drei biologischen und drei technischen Replikaten. Die statistische Auswertung (3.8) erfolgte unter Anwendung einer einfaktoriellen ANOVA und paarweisen t-Tests mit Bonferroni-Korrektur. Die auf β -Tubulin normalisierten Transkriptionslevel von SO zeigten signifikante Unterschiede (**Abbildung 18**). Die Expression von SO in Myzel mit aktivem Promoter stieg auf $2^{\Delta\Delta CT}=2.3$ und war im Verhältnis zu SO in FgPH1 ($2^{\Delta\Delta CT}=1$) um durchschnittlich 130% erhöht. Die Expression von SO in Myzel mit reprimiertem Promoter ($2^{\Delta\Delta CT}=0.4$) war im Vergleich zu FgPH1 um durchschnittlich 60% reduziert. Für alle weiteren Versuche wurden die Transformanden mit aktivem Promoter als **Fgso^{↑2.3(A-C)}** und Transformanden mit reprimiertem Promoter als **Fgso^{↓0.4(A-C)}** bezeichnet.

ERGEBNISSE

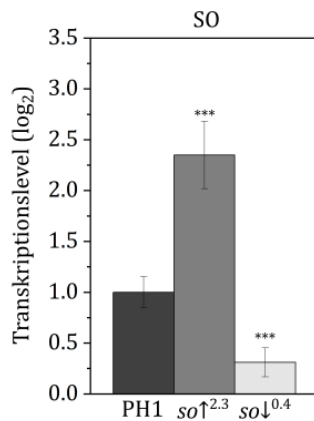


Abbildung 18: Analyse der auf β -Tubulin normalisierten Transkriptionslevel von SO mittels qPCR in FgPH1, Fgso^{↑2.3} und Fgso^{↓0.4}. Es wurde der $\Delta\Delta C_t$ -Wert ermittelt und das Expressionsverhältnis als $2^{-\Delta\Delta C_t}$ angegeben. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes an. Signifikanzlevel sind wie folgt angegeben: $p < 0.001$ '***'.

4.2.7 Herstellung der mCherry-markierten Mutante Fg_{nativSO}

Zur Erstellung einer mCherry-markieren *so*-Mutante, die unter der Kontrolle des nativen *so* Promoter steht, wurde ein Konstrukt (**p_{nativSO}/mCherry**) erstellt, das das Reportergen mCherry und eine selektierbare HygromycinB Resistenzkassette beinhaltet. Diese wurde von Bereichen flankiert, die zum gewünschten Integrationsort, dem *so* Gen, homolog sind. Hierzu wurden 1000 bp des 5' Bereichs des für das SO Protein kodierenden Gens mit mCherry über einen GS-Linker fusioniert (4.2.6). Zudem wurde die HygromycinB Resistenzkassette mit dem *downstream* Bereich des *so* Gens fusioniert. Beide Konstrukte wurden über eine *SpeI* Schnittstelle verbunden (**Abbildung 19**).

ERGEBNISSE

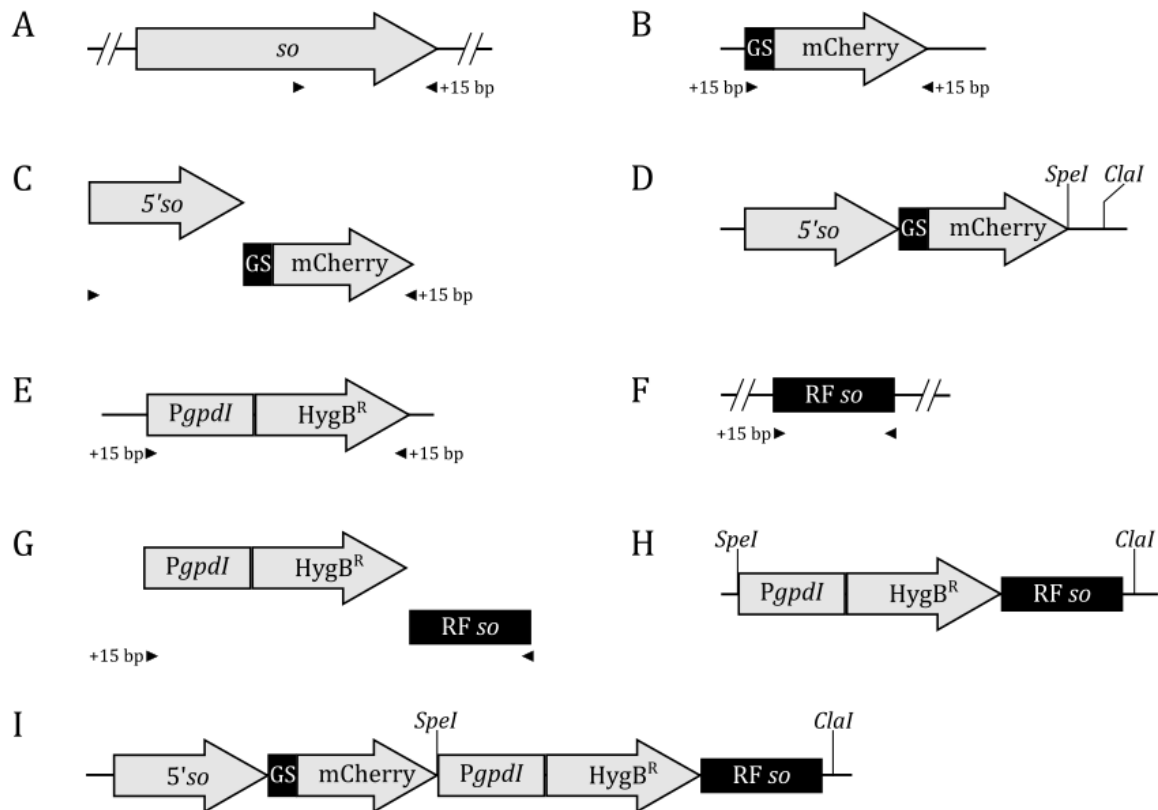


Abbildung 19: Klonierungsstrategie des Reporter-gen-markierten $p_{\text{nativso}}/mCherry$. (A) Amplifikation von 1000 bp des 5' Bereiches des für das SO Protein kodierenden Gens (*5'so*). Der *reverse* Primer beinhaltet eine 15 bp 3' Überlappungssequenz mit GS-mCherry (B) Amplifikation von **GS-mCherry** (4.2.6). Der *forward* Primer beinhaltet eine 15 bp 5' Überlappungssequenz mit *5'so*. (C) *Overlap extension* PCR der Amplifikate A und B. Der *reverse* Primer beinhaltet eine Erkennungsstelle für *SpeI* (**5'so-GS-Linker-mCherry**) (D) Klonierung des *5'so*-GS-Linker-mCherry in pJET1.2 (**pJET1.2/5'so-GS-Linker-mCherry**). (E) Amplifikation der HygromycinB Resistenzkassette (**HygB^R**). Der *forward* Primer beinhaltet eine 15 bp 5' Überlappungssequenz mit GS-mCherry. Der *reverse* Primer beinhaltet eine 15 bp 3' Überlappungssequenz mit *so* LF. (F) Amplifikation von 1000 bp des *downstream* Bereichs (linke Flanke) des *so* Gens (**so LF**). Der *forward* Primer beinhaltet eine 15 bp 5' Überlappungssequenz mit HygB^R (G) *Overlap extension* PCR der Amplifikate E und F. Der *forward* Primer beinhaltet eine Schnittstelle für *SpeI* (**HygB^R-so LF**). (H) Klonierung des HygB^R-*so* LF in pJET1.2 (**pJET1.2/HygB^R-so LF**). (I) *SpeI* Fusion des pJET1.2/HygB^R-*so* LF in pJET1.2/5'so-GS-Linker-mCherry (**p_{nativso}/mCherry**).

Für die Fusion des 5' Bereiches des *so* Gens und des mCherry Gens über einen GS Linker wurden 1000 bp des 5' Bereiches des *so* Gens aus FgPH1 gDNA mittels der Primer 41 und 42 (**Abbildung 19A**), und das mCherry Gen mit GS Linker (766 bp) aus pJET1.2/SO-mCherry mit den Primern 43 und 44 (**Abbildung 19B**) amplifiziert. Mittels *overlap extension* PCR und den Primern 41 und 44 wurde das *5'so*-GS-Linker-mCherry Amplifikat mit einer Größe von 1746 bp generiert (**Abbildung 19C**) und dem Konstrukt eine *SpeI* Erkennungsstelle hinzugefügt. Die Amplifikation wurde über ein präparatives Agarosegel isoliert, gereinigt, in pJET1.2 ligiert (**Abbildung 19D**) und in *E. coli*

ERGEBNISSE

transformiert. Mit den Primern 3 und 42 wurden positive Klone mit einem ein Amplifikat von 1062 bp detektiert. Das Plasmid eines positiven Klones (**pJET1.2/5'so-GS-Linker--mCherry**) wurde isoliert und sequenziert

Für die Fusion der HygromycinB Resistenzkassette und des *downstream* Bereiches des *so* Gens wurde die HygromycinB Resistenzkassette (1753 bp) aus **pR246_elf5A-k0** (2.6) mittels der Primer 45 und 46 (**Abbildung 19E**) und der downstream Bereich des *so* Gens (1000 bp) aus p Δ *so* (4.2.3) mit den Primern 46 und 47 (**Abbildung 19F**) amplifiziert. Mittels *overlap extension* PCR und den Primern 45 und 48 wurde das Hyg^R-*so* LF Amplifikat mit einer Größe von 2753 bp generiert (**Abbildung 19G**) und dem Konstrukt eine *SpeI* Erkennungsstelle hinzugefügt. Das Amplifikation wurde über ein präparatives Agarosegel isoliert, gereinigt, in pJET1.2 ligiert (**Abbildung 19H**) und in *E. coli* transformiert. Mit den Primern 3 und 46 wurden positive Klone mit einem ein Amplifikat von 1815 bp detektiert. Das Plasmid eines positiven Klons (**pJET1.2/Hyg^R-so LF**) wurde isoliert und sequenziert

Das pJET1.2/5'so-GS-Linker-mCherry und das pJET1.2/Hyg^R-*so* LF wurden *SpeI/ClaI* verdaut. Die *SpeI* Schnittstelle wurde über die Primer 44 und 45 hinzugefügt und die *ClaI* Schnittstelle befindet sich in der mcs des pJET1.2. Beide verdauten Plasmide wurden über ein präparatives Agarosegel isoliert, gereinigt und ligiert (**Abbildung 19I**) und in *E. coli* transformiert. Die erhaltenden Kolonien wurden mit den Primern 43 und 46 getestet. Positive Klone wiesen ein Amplifikat von 2488 bp auf (**p_{nativ}so/mCherry**). Das Plasmid von p_{nativ}so/mCherry wurde isoliert und sequenziert.

Für die Transformation von p_{nativ}so/mCherry wurde das Konstrukt mittels der Primer 41 und 48 (**Abbildung 20A1, schwarze Dreiecke**) amplifiziert, gereinigt und in Fg Δ *pks12* transformiert (4.2.1) und auf CM(F)_{HygB} (2.3) selektiert. Zur Überprüfung wurden 10 Transformanden sequenziert. Sieben Transformanden, die die korrekte Sequenz aufwiesen, wurden mittels Southern Blot analysiert. Hierfür wurde gDNA von 7 Transformanden isoliert und *XhoI* verdaut. Eine DIG-markierte Sonde, homolog zu der mCherry Sequenz mit einer Größe von 729 bp wurde mit den Primern 38 und 39 erstellt (**Abbildung 20A**). Als Positivkontrolle diente das *NotI/ClaI* verdaute p_{nativ}so/mCherry. Es zeigte eine erwartete Bande bei 3411 bp und eine Bande bei 7379 bp, was auf einen unvollständigen Verdau des Plasmids deutet. Alle Transformanden zeigten eine einzelne Bande bei ca. 4652 bp, was auf die Integration am Zielort hindeutet (**Abbildung 20B**). Die Transformanden 20 und 27 (**Fg_{nativ}so^A** und **Fg_{nativ}so^B**) wurden für alle weiteren Versuche genutzt.

ERGEBNISSE

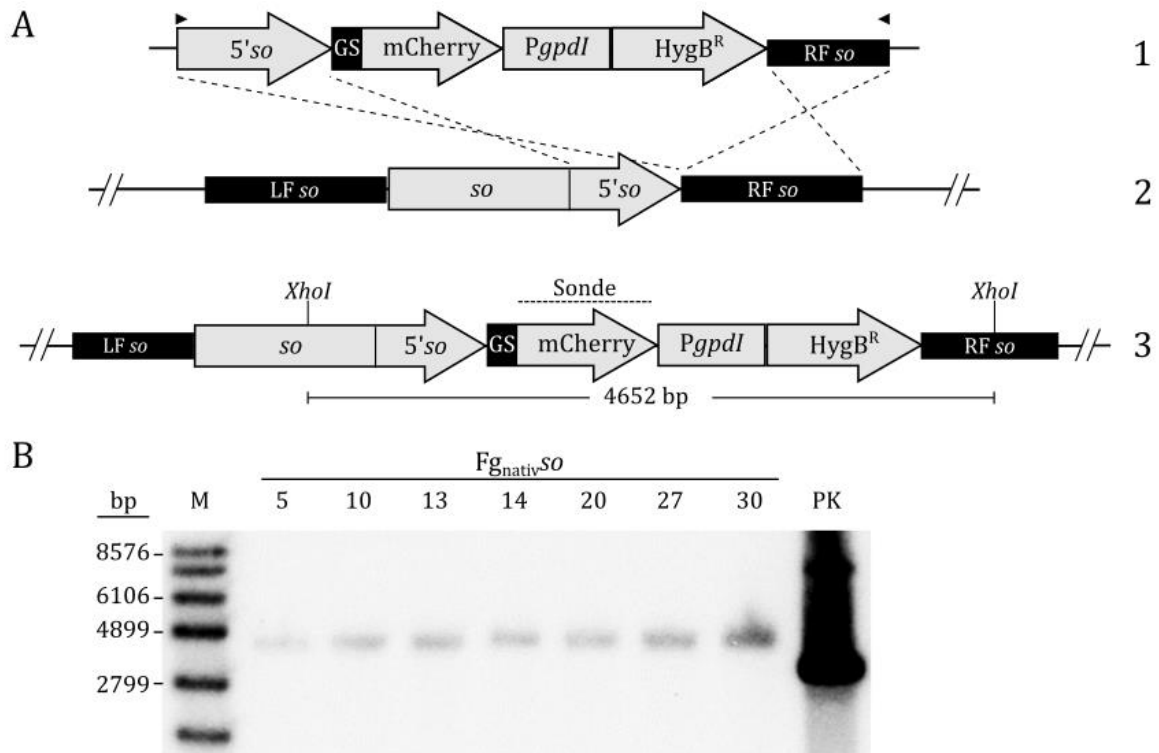


Abbildung 20: Austauschstrategie und Southern Blot zum Nachweis der Integration des $p_{nativSO}/mCherry$ in $Fg\Delta pks12$. (A) Austausch- und Hybridisierungsstrategie von $p_{nativSO}/mCherry$. Die Amplifikation des $nativSO/mCherry$ erfolgte mit den Primern 41 und 48 von $p_{nativSO}/mCherry$ (schwarze Dreiecke) (1). Der Austausch erfolgt durch homologe Rekombination in dem 5'Bereich des so Gens (2). In (3) ist der Genotyp des transformierten $Fg_{nativSO}$ Stammes dargestellt. Der Bereich, der als Sonde für den Southern Blot diente ist mit gestrichelten Linien dargestellt. (B) Southern Blot von *XhoI* verdauter gDNA der Transformanden M: DNA Molecular Weight Marker VII (Roche, Penzberg, Deutschland); 5, 10, 13-14, 20, 27, 30: getestete Transformanden; PK: *NotI/Clal* verdautes $p_{nativSO}/mCherry$. Transformanden zeigten bei richtiger Integration eine Bande bei 4652 bp. Die Transformanden 20 und 27 werden im Folgenden als $Fg_{nativSO}^A$ und $Fg_{nativSO}^B$ bezeichnet und für alle weiteren Versuche genutzt.

4.3 Einfluss von Hex-1 und SO auf die horizontale und vertikale Ausbreitung

Um den Einfluss der Proteine Hex-1 und SO auf die horizontale und vertikale Ausbreitung zu analysieren, wurden mindestens zwei unabhängige Transformanden jeder Mutante mit FgV-Ch9 infiziert. Die Stabilität der Virusinfektion und die Anzahl von Konidien, die nach Auskeimung virusinfiziertes Myzel aufweisen, wurde von den Transformanden *FgΔpks12*, *FgΔhex-1*, *FgΔso*, *FgΔhex-1/Δso*, *Fg^{OE}hex-1* und *Fg^{OE}so* untersucht, um mögliche Funktionen der Proteine in diesen Prozessen zu analysieren.

4.3.1 Virusinfektionen von Hex-1 Überexpression und Deletion sowie SO

Überexpression waren erfolgreich

Alle Mutanten (4.2) wurden über Ko-Kultivierung (3.3.1) mit FgV-ch9 infiziert. Zum Virusnachweis wurde RNA aus Myzel nach 3 Tagen Inkubation in Flüssigkultur (3.1.2) von potenziell infizierten Mutanten extrahiert (3.5.5). Nach Auftrennung auf einem Agarosegel (3.4.3) wurden zwei Banden zwischen 3500 und 3000 bp bei kurzer Auftrennung erwartet. Diese entsprechen der Größe der viralen dsRNA Segmente von FgV-ch9. Als Positivkontrolle diente der Stamm Fgch9 (2.2.2), als Negativkontrolle ein nicht infizierter FgPH1 Stamm. Die Deletionsmutanten *FgΔpks12* und *FgΔhex-1* sowie die Überexpressionsmutanten *Fg^{OE}hex-1* und *Fgso^{↑2.3}* zeigten ebenso wie *Fg^{nativ}so* virusspezifische Banden bei 3500 und 3000 bp (**Abbildung 21A**). Die Mutanten *FgΔso* und *FgΔhex-1/Δso* (**Abbildung 21A, 6 und 7**) zeigten wie die Negativkontrolle keine virusspezifischen dsRNA Banden. Bei 2000 bp und leicht unter der 1500 bp Bande sind rRNA-Banden erkennbar (**Abbildung 21: (Abbildung 21A)**). Diese Ergebnisse zeigen eine erfolgreiche Infektion mit FgV-ch9 für die Mutanten *FgΔpks12*, *FgΔhex-1*, *Fg^{OE}hex-1* und *Fgso^{↑2.3}*.

4.3.2 SO-Deletionsmutanten konnten über die Kontrolle des regulierbaren

Promoter *Tcu* indirekt infiziert werden

Da die Virusinfektion von *FgΔso* und *FgΔhex-1/Δso* nicht erfolgreich war (4.3.1), wurde die Mutante *Fgso* (4.2.6) erstellt und unter aktivem *Tcu* Promoter (*Fgso^{↑2.3}*) über Ko-Kultivierung mit FgV-ch9 infiziert (3.3.1). Nach nachgewiesener Virusinfektion über Nachweis der dsRNA Banden (**Abbildung 21A, 10-12**) wurden die Mutanten zusätzlich unter SO reprimierenden Bedingungen kultiviert und das Vorhandensein von Virus erneut bestätigt (**Abbildung 21B**). Die Mutanten zeigten das für eine Infektion typische

ERGEBNISSE

Bandenmuster (**Abbildung 21**) und werden im Folgenden als **Fgso**↓^{0.4}(A, B, C) bezeichnet (4.2.6).

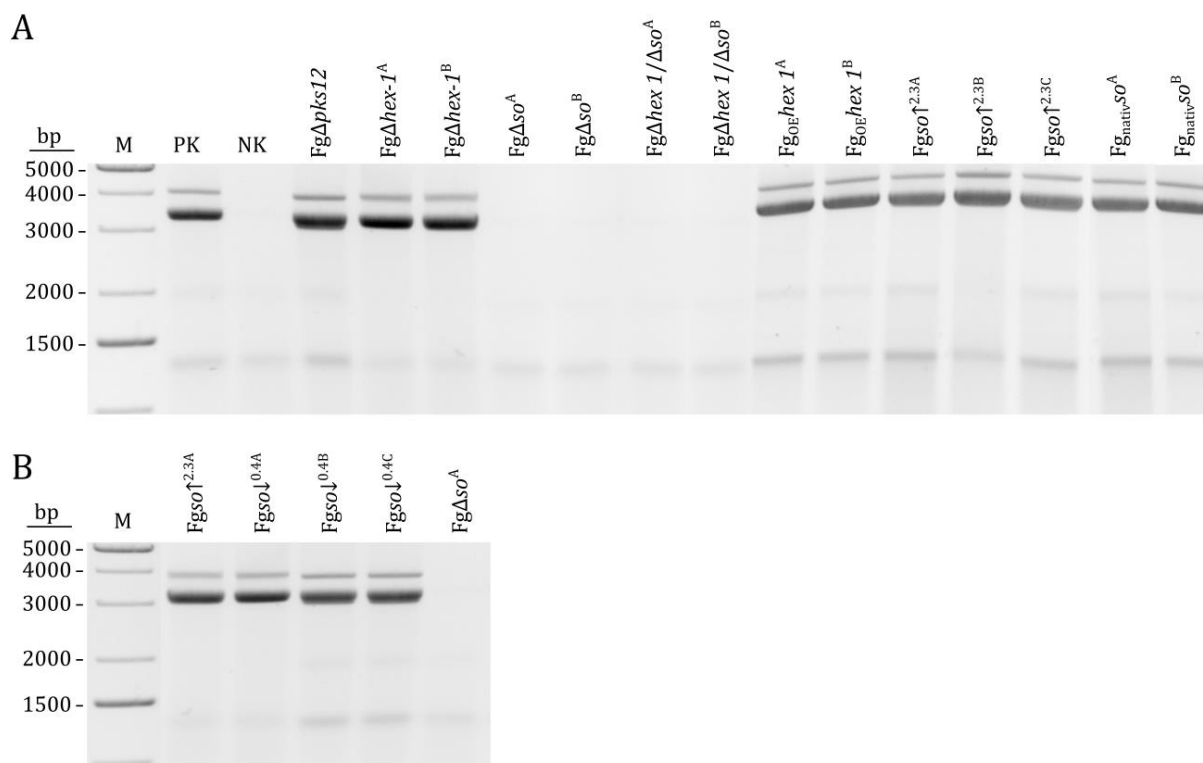


Abbildung 21: RNA-Muster von potenziell virusinfiziertem Pilzmyzel der Mutanten FgΔpks12, FgΔhex-1, FgΔso, FgΔhex-1/Δso, Fg_{OE}hex-1, Fgso^{↑2.3} und Fgso^{↓0.4}. Die RNA wurde auf einem 1% (w/v) Agarosegel aufgetragen und mit Ethidiumbromid gefärbt. M: 1 kb Plus DNA-Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA); PK: Fgch9; NK: FgPH1

4.3.3 Die Virusinfektion hat keinen Einfluss auf die Transkriptionslevel von Hex-1 und SO

Zur Überprüfung des Einflusses der Virusinfektion auf die mRNA Transkriptionslevel von Hex-1 und SO wurde Myzel virusfreier und virusinfizierter FgPH1 Mutanten in Flüssigkultur (3.1.2) über 3 Tage angezogen und die RNA extrahiert (3.5.5). Die Proben wurden, wie in 4.2.6 beschrieben aufbereitet und für die quantitative Messung der mRNA das Transkriptionslevel analysiert. Die Analyse erfolgte mit je drei biologischen und drei technischen Replikaten.

Das Ergebnis der qPCR zeigte, dass Hex-1 und SO in virusfreiem und virusinfiziertem Myzel auf einem ähnlichen Niveau exprimieren (**Abbildung 22**). Die Transkriptionslevel von Hex-1 und SO wurden am als konstant vorausgesetztem Transkriptionslevel des β-Tubulins normalisiert und in virusfreiem Myzel bei $2^{\Delta\Delta CT}=1$ definiert. In virusinfiziertem Myzel stieg das Transkriptionslevel von Hex-1 auf 1.25 und das Transkriptionslevel von SO auf 1.2. Die Messergebnisse in virusinfiziertem Myzel liegen

ERGEBNISSE

um 20-25% höher. Die Ergebnisse waren jedoch nicht statistisch signifikant unterschiedlich.

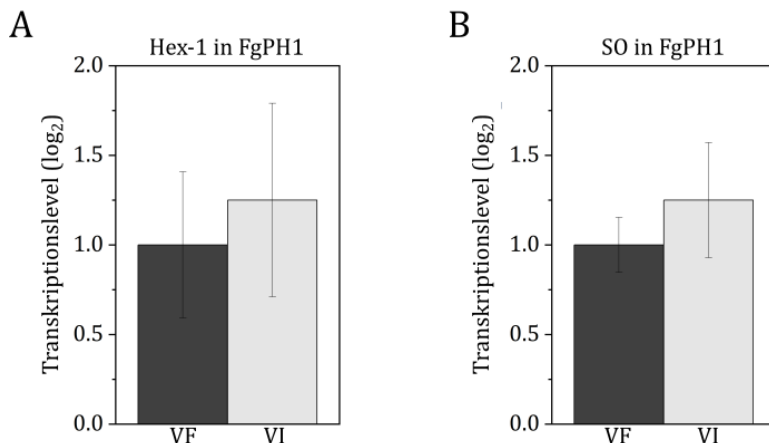


Abbildung 22: Transkriptionslevel von Hex-1 und SO in Abhängigkeit von einer FgV-ch9 Infektion. Es wurde der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert ermittelt. Als Haushaltsgen wurde β -Tubulin gewählt, um die Werte zu normalisieren. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes an. Signifikanzlevel sind wie folgt angegeben: $p > 0.05$ 'kein signifikanter Unterschied' (A) Transkriptionslevel von Hex-1 in virusfreiem und virusinfiziertem FgPH1. (B) Transkriptionslevel von SO in virusfreiem und virusinfiziertem FgPH1.

4.3.4 Die Virusinfektion ist in den Mutanten stabil

Um zu überprüfen, ob die Virusinfektion in den Mutanten stabil ist, wurden alle virusinfizierten Mutanten (4.3.1, 4.3.2) auf Festmedium (C_{CM} und C_{ICM}) (2.3) angezogen. Nach sieben Tagen wurde 2 cm² Myzel ausgestochen (3.1.1) und auf neues Festmedium (C_{CM} und C_{ICM}) umgesetzt. Dieser Vorgang wurde insgesamt fünf mal wiederholt und RNA von Myzel der ersten, dritten und fünften Subkultivierung extrahiert und auf einem Agarosegel (3.4.3) aufgetrennt. Alle Mutanten zeigten in allen getesteten Subkultivierungen die für FgV-ch9 charakteristischen Banden bei 3500 bp und 3000 bp. Die Virusinfektion ist somit stabil nach Subkultivierung. Bei 2000 bp und leicht unter der 1500 bp Bande sind typische pilzliche rRNA-Banden erkennbar (**Abbildung 23**).

ERGEBNISSE

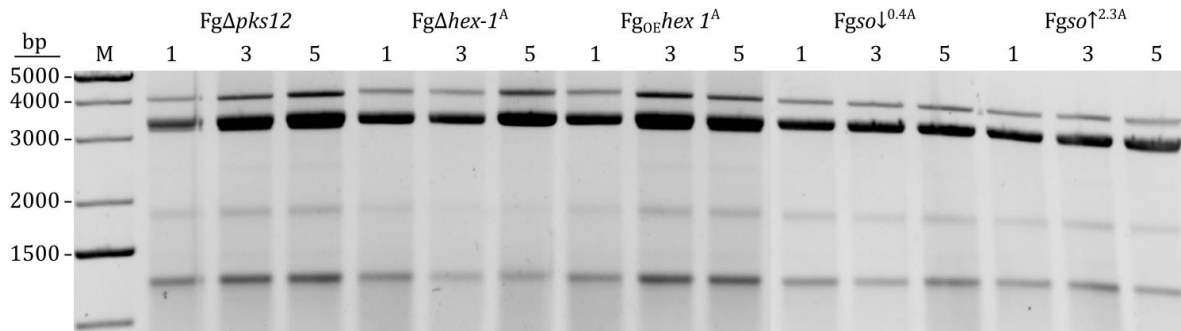


Abbildung 23: Nachweis der Stabilität der Virusinfektion. RNA-Extraktion von virusinfiziertem Myzel aus verschiedenen Subkultivierungen. Die RNA wurde auf einem 1% (w/v) Agarosegel aufgetragen und mit Ethidiumbromid gefärbt. M: 1 kb Plus DNA-Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA); 1: Subkultur 1; 3: Subkultur 3; 5: Subkultur 5

4.3.5 Unabhängige Virusinfektionen resultieren in Kulturen mit hoher und niedriger Viruslast

Um Kulturen mit hoher und niedriger Viruslast zu generieren, wurde zunächst mittels ELISA ein Standard zur Berechnung der Viruslast generiert (3.5.6, 3.8) und dieser mit hypovirulenten Phänotypen von virusinfiziertem Myzel korreliert (**Abbildung 24**).

Zur Erstellung des Standards wurde eine Eichkurve (3.5.6) aus Gemischen von virusfreiem Myzel und Polysomen aus virusinfiziertem Myzel (3.2) erstellt, 1:250 bis 1:5000 verdünnt und mittels ELISA analysiert. Die 1:250 Verdünnung zeigte eine durchschnittliche Absorption (OD 405 nm) von 0.986 und wurde als 100% Standard festgelegt. Die 1:1000 Verdünnung zeigte eine Absorption von ca. 0.084 und wurde damit als ~8% vom Standard festgelegt (**Abbildung 24A**). Die Messungen wurden mit virusinfiziertem Myzel von ähnlicher Absorption verglichen, um einen Schwellenwert für virusinfiziertes Myzel, das noch einen virusinduzierten hypovirulenten Phänotyp zeigt, zu definieren. Messungen mit einem geringeren Wert als der gemessenen relativen Viruslast von 8% zeigten keinen virusbedingten Phänotyp und wurden als nicht messbare Viruslast definiert (**Abbildung 24B**). Die Rohdaten der ELISA Analysen zur Berechnung der relativen Viruslast sind **Anhang 3A** und **Anhang 3B** zu entnehmen.

ERGEBNISSE

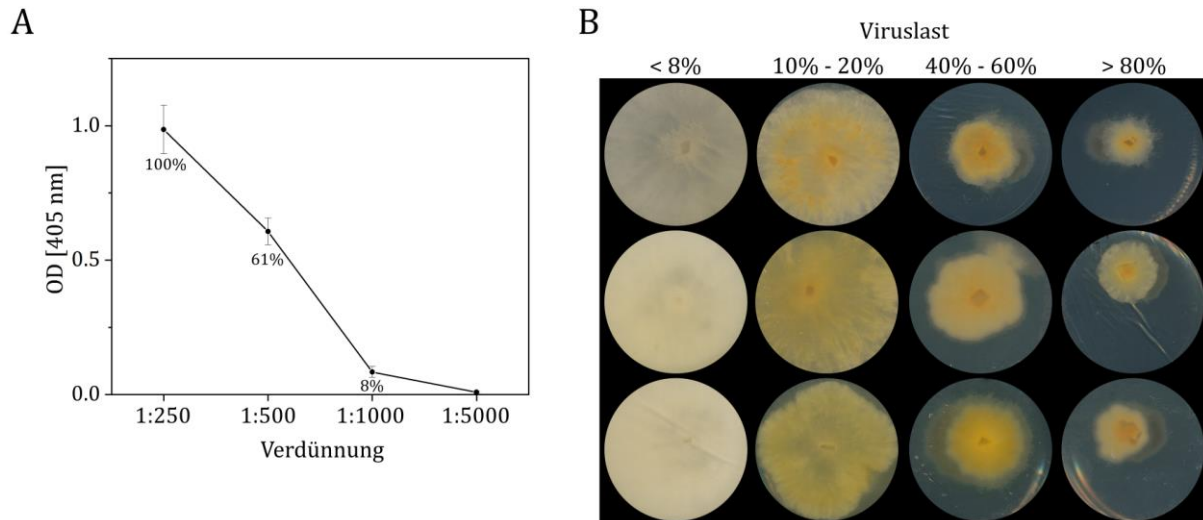


Abbildung 24: ELISA-Analyse zur Bestimmung der mit einem hypovirulenten Phänotyp korrelierenden messbaren Viruslast. (A) Eichkurve aus Gemischen von virusfreiem Myzel und Polysomen aus virusinfiziertem Myzel. Verdünnungen: 1:250, 1:500, 1:1000 und 1:5000. 1:250 Verdünnung wurde als 100% Standard festgelegt und die weiteren Verdünnungen auf 100% normalisiert: 1:250 = 100%, 1:500 = 61%, 1:1000 = 8%, 1:5000 = 2%. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes an. (B) Phänotypische Analyse von virusinfiziertem Myzel. Myzel wurde mittels ELISA analysiert und phänotypisch eingeordnet. Myzel mit einer gemessenen Viruslast von unter 8% zeigte keinen virusinduzierten hypovirulenten Phänotyp.

Um Kulturen mit hoher und niedriger Viruslast zu generieren, wurden die Mutanten dreimal unabhängig voneinander mit FgV-ch9 über Ko-Kultivierung infiziert (3.3.1). Myzel mit nachgewiesener Infektion über RNA-Extraktion (3.5.5) wurden in 9 cm Petrischalen mit CM bzw. Induktions-CM inkubiert (3.1.1). Nach 7 Tagen Anzucht, wurden vier konzentrisch auf den Platten verteilte Stichproben erneut auf Festmedium (C_{CM} und C_{ICM}) überimpft und fünf Tage inkubiert (3.1.1). Das Myzel wurde mit Hilfe des ELISA auf relative Viruslast untersucht (3.5.6).

Die drei Infektionen der *FgΔpks12* Mutante zeigen mittlere Viruskonzentrationen von 8% bis 53%. Die *FgΔhex-1* Mutanten zeigen mittlere Viruskonzentrationen von 10% bis 63%. *Fg Δ hex-1* zeigt eine Viruskonzentration von 9% bis 82% und *Fgso \downarrow ^{0.4}* von 11% bis 82%. Die drei Infektionen der *Fgso \uparrow ^{2.3}* Mutante zeigen mittlere Viruskonzentrationen von 10% bis 67% (**Abbildung 25**).

Die Virusverteilung und -last nach Infektion im Myzel unterlag nur geringen Schwankungen ($\sigma = 29\%$), wohingegen die Virusverteilung und -last zwischen verschiedenen Infektionen sehr stark schwanken konnte ($\sigma = 74\%$). Signifikante Unterschiede zwischen den Mutanten in der allgemeinen Virusverteilung und -last konnten nicht detektiert werden. Von allen Mutanten konnten Kulturen mit hoher und

ERGEBNISSE

niedriger Viruslast generiert werden. Kulturen mit einer hohen Viruslast zeigten ein stark reduziertes Wachstum und eine Gelbfärbung des Myzels. Kulturen mit einer geringen Viruslast unter 8% des Standards zeigten keinen virusinduzierten hypovirulenten Phänotyp.

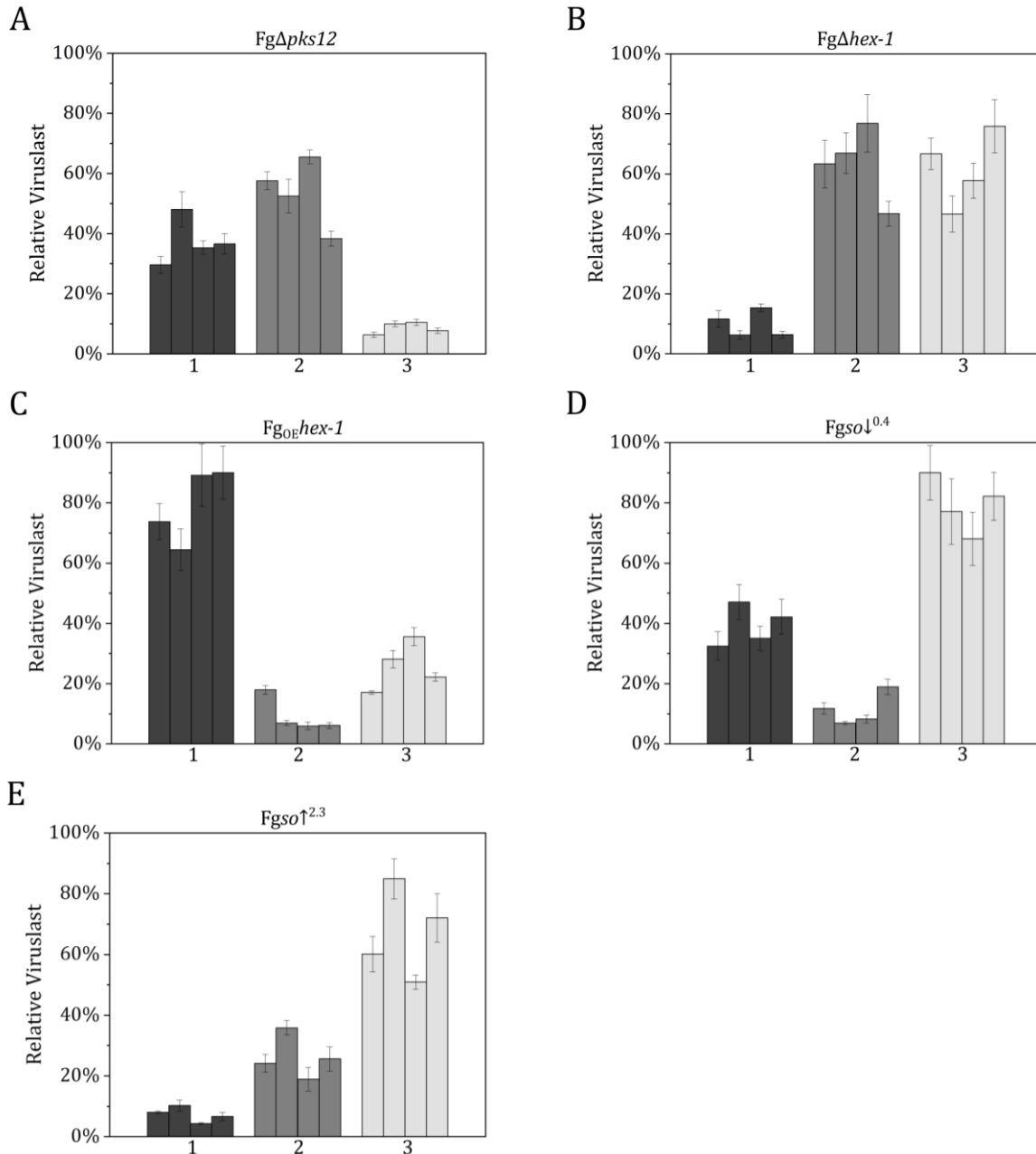


Abbildung 25: Viruslast innerhalb Kulturen der gleichen Virusinfektion und von Kulturen von verschiedenen Virusinfektionen. Als Standard wurde eine 1:250 verdünnte Polysomenextraktion genutzt und auf 100% gesetzt. Die relative Viruslast ist in Prozent in Abhängigkeit zum Standard angegeben. Kulturen mit einer Viruslast von über 8% zeigten eine Wuchsminderung, die auf einen hypovirulenten Phänotyp hindeutet. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes an. (A) Virusverteilung drei unabhängiger Infektionen in *FgΔpks12*. (B) Virusverteilung drei unabhängiger Infektionen in *FgΔhex-1*. (C) Virusverteilung drei unabhängiger Infektionen in *Fg_{OE}hex-1*. (D) Virusverteilung drei unabhängiger Infektionen in *Fgso^{↓0.4}*. (E) Virusverteilung drei unabhängiger Infektionen in *Fgso^{↑2.3}*.

4.3.6 Der Anteil virusinfizierter Konidien ist bei niedriger Viruslast des Ausgangsmyzels höher als bei hoher Viruslast des Ausgangsmyzels

Um den Anteil virusinfizierter Konidien im Wildtyp zu ermitteln, wurden in drei unabhängigen Infektionen Konidien von virusinfizierten FgPH1 mit unterschiedlicher Viruslast (nicht gezeigt) hergestellt. Es wurden 120 Konidien je Mutante auf CM-Festmedium vereinzelt (3.1.1), in Flüssigkultur überführt und für 3 Tage inkubiert (3.1.2). Anschließend wurde die relative Viruslast mittels ELISA bestimmt (3.5.6). Einzelwerte der ELISA Analyse sind **Anhang 3C** zu entnehmen.

In **Abbildung 26** ist das Ergebnis der ELISA Analyse zusammengefasst dargestellt. Versuchsansatz 1 zeigte bei ca. 20%, Versuchsansatz 2 bei ca. 35% und Versuchsansatz 3 bei ca. 25% der Konidien eine Viruslast von $\geq 8\%$ vom Standard. Somit zeigten durchschnittlich 30% der Konidien eine Viruslast, die einen hypovirulenten Phänotyp hervorruft (4.3.5). Beispiele von virusinfiziertem Myzel und der korrelierenden Viruslast sind in **Abbildung 24B** gezeigt.

Die Viruslast im Myzel von ausgekeimten Konidien der Mutanten *FgΔpks12*, *FgΔhex-1*, *Fg_{OE}hex-1*, *Fgso \downarrow ^{0.4}* und *Fgso \uparrow ^{2.3}* wurden untersucht, um den Anteil von Konidien zu bestimmen, die zu einem hypovirulenten Phänotyp führen. Hierzu wurden virusinfizierte Mutanten mit jeweils vergleichbarer Viruslast ausgewählt. (4.3.5). Dabei wurden jeweils zwei virusinfizierte Mutanten mit einer relativen Viruslast von 8%-11% und einer relativen Viruslast von 58%-77% gewählt (**Abbildung 25**).

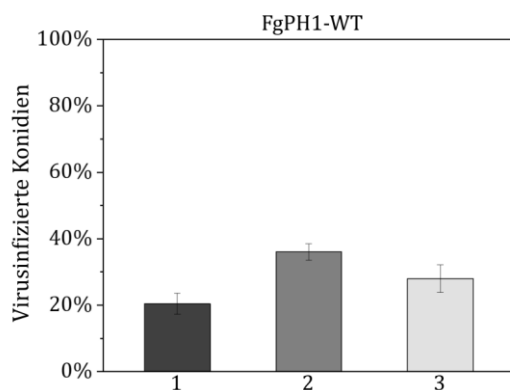


Abbildung 26: Anzahl der virusinfizierten Konidien in FgPH1. Dargestellt sind drei unabhängige Versuchsansätze. Es wurden je 40 Konidien eines virusinfizierten FgPH1 analysiert. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes an. 1: 20% infizierte Konidien; 2: 35% infizierte Konidien; 3: 25% infizierte Konidien.

Es wurden in sechs unabhängigen Ansätzen Konidien der virusinfizierten Mutanten erzeugt (3.1.4), je zehn vereinzelt und für sechs Tage auf C_{CM} und C_{ICM} inkubiert (3.1.1).

ERGEBNISSE

Anschließend wurde die relative Viruslast von je 60 ausgekeimten Konidien von Mutanten mit geringer und hoher Viruslast mittels ELISA bestimmt (3.5.6). Einzelwerte der ELISA Analyse sind **Anhang 3D** bis **Anhang 3H** zu entnehmen. Es wurde eine Eichkurve erstellt, die 1:250 Verdünnung als 100% Standard und die 1:1000 Verdünnung als 8% Standard festgelegt, um eine relative Berechnung der Viruslast in den Mutanten zu ermöglichen. Mutanten mit einer Viruslast $\geq 8\%$ zeigten auf C_{CM} und C_{ICM} einen hypovirulenten Phänotyp (4.3.5). Die Ergebnisse der ELISA Analyse sind in **Abbildung 27** zusammengefasst.

In 22% der Konidien von *Fg Δ pks12* mit einer geringen Viruskonzentration war eine Viruslast von über 8% vom Standard detektierbar. Aus Myzel mit einer hohen Viruskonzentration wurden 14% infizierte Konidien ($\geq 8\%$) produziert. *Fg Δ hex-1* produzierte aus Myzel mit einer geringen Viruskonzentration 42% und aus Myzel mit einer hohen Viruskonzentration 22% virusinfizierte Konidien. *Fg Δ hex-1* mit einer geringen Viruskonzentration produzierte 26% und mit einer hohen Viruskonzentration 14% virusinfizierte Konidien. *Fgso \downarrow ^{0.4}* mit einer geringen Viruskonzentration produzierte 42% virusinfizierte Konidien, aus Myzel mit einer hohen Viruskonzentration wurden 8% infizierte Konidien produziert. *Fgso \uparrow ^{2.3}* mit einer geringen Viruskonzentration produzierte 90% und mit einer hohen Viruskonzentration 30% infizierte Konidien.

Die 90% virusinfizierte Konidien von *Fgso \uparrow ^{2.3}* stellen einen signifikanten Unterschied zu allen anderen Ergebnissen der Mutanten dar, die im Durchschnitt 25% virusinfizierte Konidien produzierten.

Die Anzahl an erzeugten virusinfizierten Konidien ist zwar in allen Mutanten mit geringer Viruslast höher als in Mutanten mit hoher Viruslast, der Unterschied ist aber nicht signifikant.

ERGEBNISSE

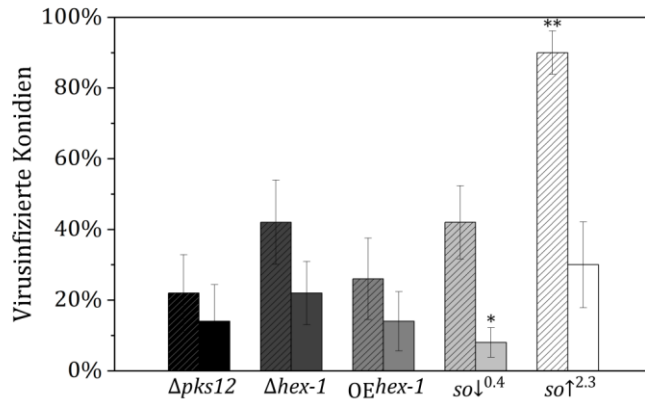


Abbildung 27: Anzahl von virus-infizierten Konidien produziert von den Mutanten in Abhängigkeit der Viruslast vom Ausgangsmyzel. Dargestellt ist die Analyse auf Virusinfektion von Myzel von 60 ausgekeimten Konidien pro Säule mittels ELISA. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes an. Signifikanzlevel sind wie folgt angegeben: $p < 0.01$ ‘***’, $p < 0.05$ ‘*’, $p > 0.05$ ‘kein signifikanter Unterschied’. Virusinfizierte Konidien aus Myzel mit einer geringen Viruskonzentration sind gestreift, aus Myzel mit einer hohen Viruskonzentration ungemustert dargestellt.

4.4 Charakterisierung der Mutanten zur Analyse der Funktion der deletierten und überexprimierten Gene in *F. graminearum*

Bei der Charakterisierung der *Fusarium*-Mutanten wurden verschiedene Aspekte der Virulenz genauer betrachtet, um eine Erklärung für die unterschiedlichen Effizienzen der Virustransmission in die Konidien zu erörtern. So wurden die Lokalisation der Proteine und die morphologischen Eigenschaften der Mutanten makroskopisch und mikroskopisch in Hinblick auf Phänotyp, sexuelle und asexuelle Fortpflanzung sowie Infektiosität betrachtet.

4.4.1 Hex-1 aggregiert in der Nähe der Septumsporen und SO akkumuliert an den Hyphenspitzen

Für den Einfluss der beiden untersuchten Proteine Hex-1 und SO auf eine Virusinfektion ist die subzelluläre Lokalisation der Proteine in *F. graminearum* von zentraler Bedeutung. Die Lokalisation der überexprimierten Proteine *in vivo* konnte mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie verfolgt werden, da die Überexpressionsproteine Fg_{OE}hex-1 mit GFP (4.2.5) und Fg_{so} mit mCherry (4.2.6) markiert worden waren. Die Expression der Fusionsproteine *in vivo* wurde in über Nacht, aus Flüssigkultur gekeimten Konidien untersucht. Zur besseren Detektier- und Vergleichbarkeit erfolgten die Experimente in Mutanten in denen das pks12-Gen deletiert war, um die Produktion der für die Lokalisation von mCherry-Fusionsproteinen störenden Pigmente Aurofusarin und Rubrofusarin zu inhibieren.

Bei Myzel von eGFP-Hex-1 sollte die Lokalisation der hauptsächlich aus dem Hex-1 Protein bestehenden *Woronin bodies* in Abhängigkeit zu einer Virusinfektion detektiert werden. *Woronin bodies* sind nahe der septalen Poren an den Septen verankert.

Das eGFP-Hex-1 wurde an den Septen der Pilzhyphen unabhängig von der FgV-ch9 Infektion detektiert (**Abbildung 28A**). Weitere vereinzelte Fluoreszenzsignale waren, ebenfalls unabhängig von einer Virusinfektion, verteilt in der Zelle vorhanden (**Abbildung 28B**). Kontrollexperimente mit eGFP markiertem Hex-1 in Mutanten in denen das pks12-Gen nicht deletiert war, zeigten ähnliche Verteilungsmuster (**Anhang 4**).

ERGEBNISSE

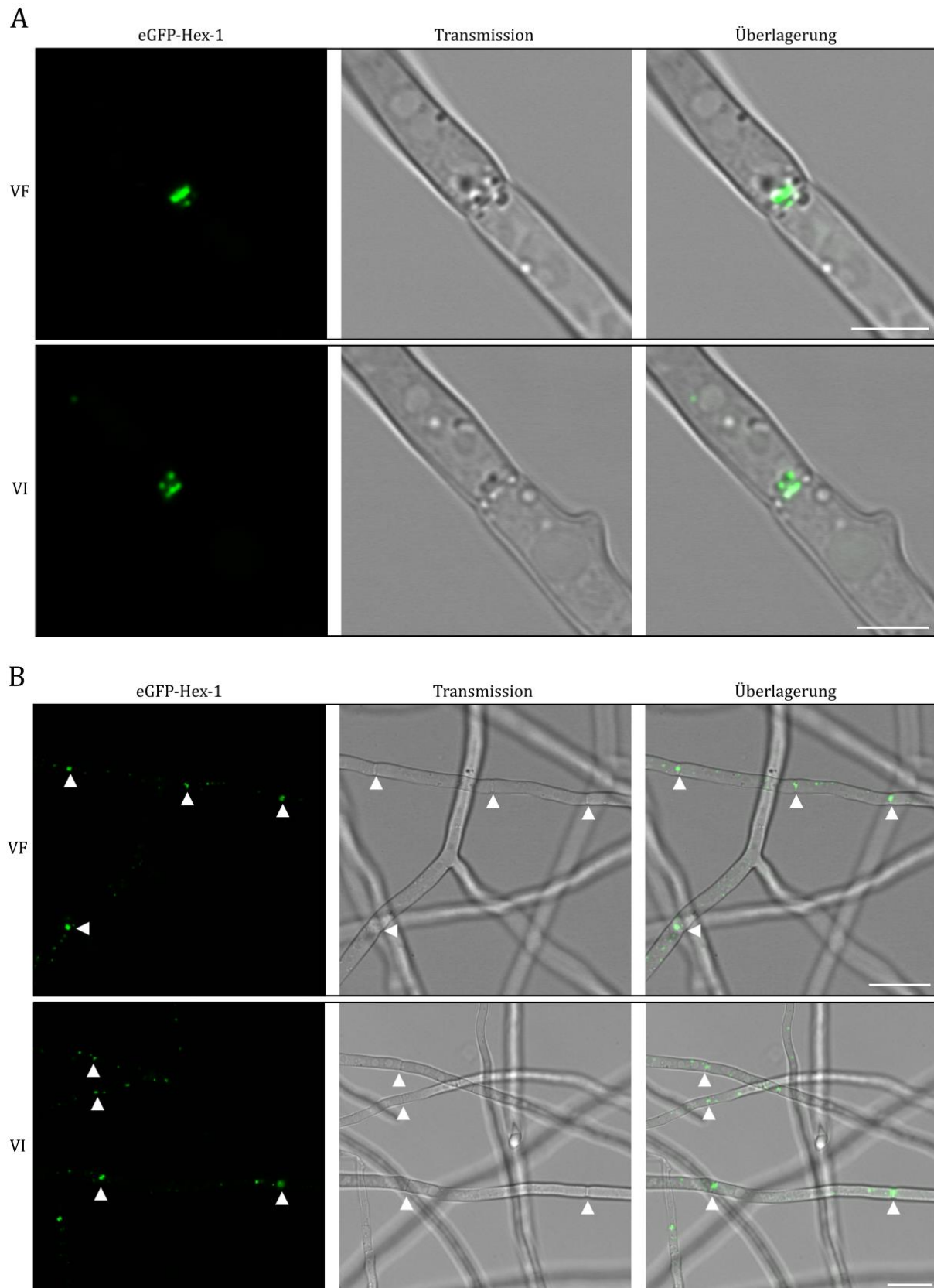


Abbildung 28: Subzelluläre Lokalisation von eGFP-Hex-1. eGFP-Hex-1 ist an den Septen (A, Maßstab = 5 μm) und vereinzelt im Zytoplasma (B, Maßstab = 20 μm) in FgV-ch9 infiziertem (VI) und virusfreiem (VF) Myzel lokalisiert. In (B) sind die Septen mit weißen Dreiecken gekennzeichnet.

ERGEBNISSE

Das SO-mCherry konnte sowohl frei im Zytoplasma (**Abbildung 29A**) als auch an den Hyphenspitzen (**Abbildung 29B**) detektiert werden. In Myzel mit unterschiedlichen Viruskonzentrationen (8% bis 67%, 4.3.5) konnten keine Unterschiede - wie beispielsweise eine vermehrte Aggregation an den septalen Poren - in An- oder Abwesenheit einer Virusinfektion mit verschiedenen Viruslasten detektiert werden.

Myzel der Fg_{nativSO} Mutante, die SO unter nativem Promoter mit fusioniertem mCherry exprimiert, zeigte keine detektierbare Fluoreszenz (nicht gezeigt).

ERGEBNISSE

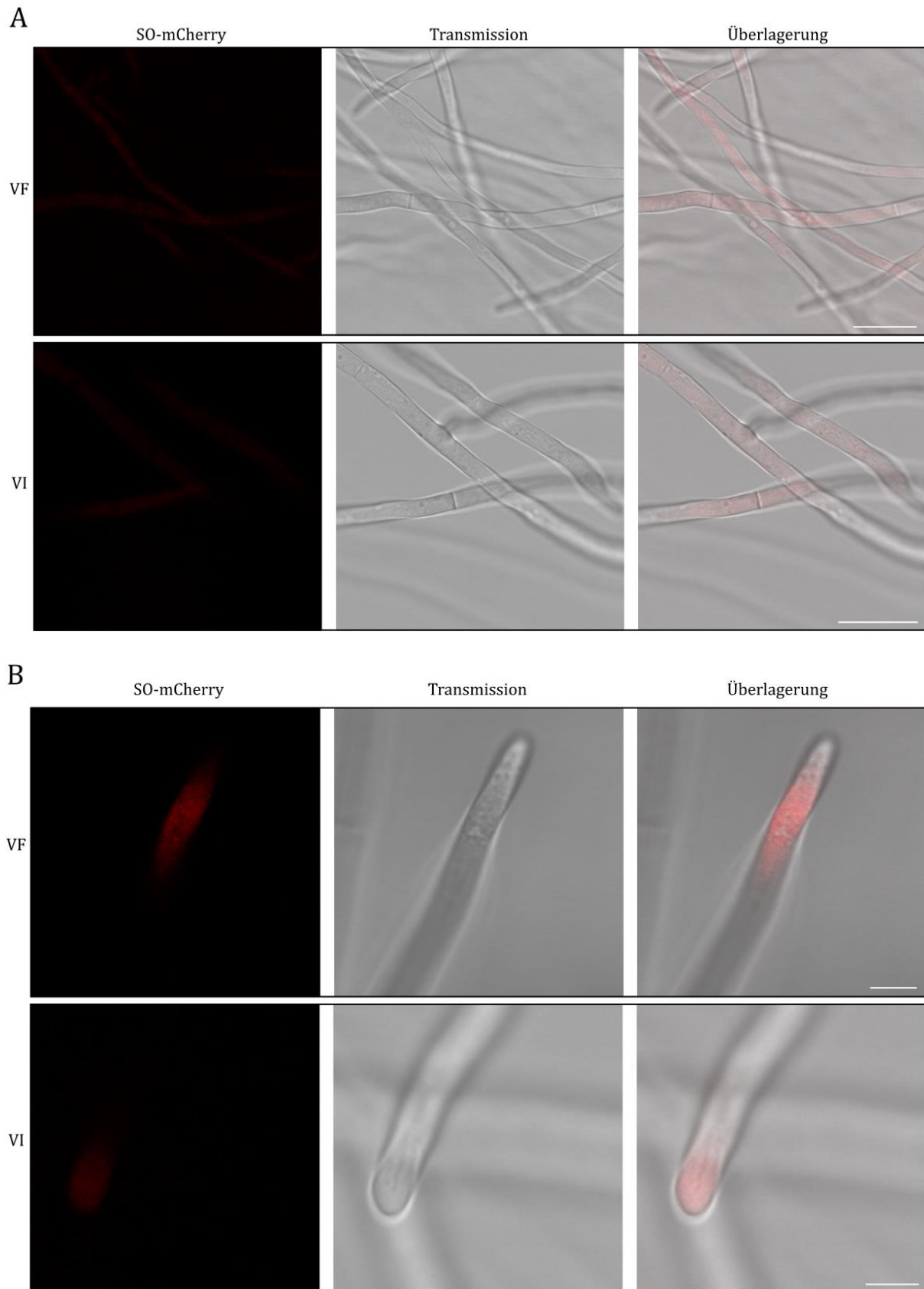


Abbildung 29: Lokalisation von SO-mCherry. SO-mCherry ist im Zytoplasma der Hyphen (A, Maßstab = 20 μm) und (B, Maßstab = 5 μm), in den Hyphenspitzen zu erkennen und sowohl im virusfreien Myzel (VF) als auch im: virusinfizierten (VI) lokalisiert.

ERGEBNISSE

4.4.2 Die Deletion von SO führt zu weniger stark verzweigtem Myzel

Zur mikroskopischen Analyse der morphologischen Eigenschaften der verschiedenen Mutanten wurden diese auf CM-Platten für 5 Tage bei 28°C inkubiert und das Luftmyzel analysiert (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

In **Abbildung 30** sind typische mikroskopische Aufnahmen der Mutanten und des Wildtyps FgPH1 dargestellt. Das Myzel der Mutanten mit einer deletiertem *so* Gen oder reprimierter *SO* Expression (Fg Δ *so*, Fg Δ *hex-1*/ Δ *so* und Fg $so^{\downarrow 0.4}$) zeigten weniger Verzweigungen als das Myzel der FgPH1 Kontrolle. Das Myzel aller anderen Mutanten zeigte zum Myzel von FgPH1 ein vergleichbares Verzweigungsmuster. Es konnten keine Unterschiede in Breite und Länge der Hyphen detektiert werden. Virusinfiziertes Myzel zeigte die gleichen morphologischen Eigenschaften wie virusfreies Myzel.

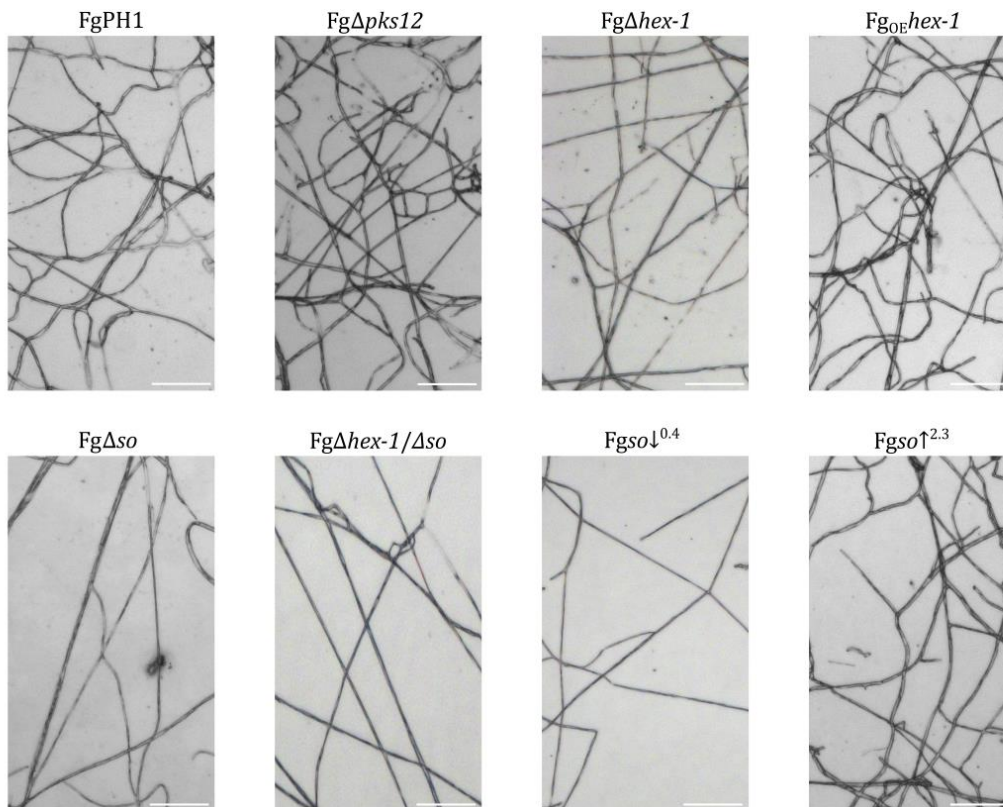


Abbildung 30: Luftmyzel der *F. graminearum* Mutanten. Es ist Luftmyzel von virusfreien FgPH1, Fg Δ *pks12*, Fg Δ *hex-1*, Fg OE_{hex-1} , Fg Δ *so*, Fg Δ *hex-1*/ Δ *so*, Fg $so^{\downarrow 0.4}$, und Fg $so^{\uparrow 2.3}$ gezeigt. Maßstab = 100 μ m.

4.4.3 Untersuchung zur Sporenbildungs- und Keimungsfähigkeit

Perithezien sind die Fruchtkörper von *F. graminearum* in denen sich in der Regel die Ascosporen befinden. Zudem bildet *F. graminearum* asexuelle Sporen (Konidien) durch Zellabschnürung. Im Folgenden wird gezeigt, ob die virusfreien und virusinfizierten

F. graminearum Mutanten die Fähigkeit besitzen, Perithezien und keimungsfähige Konidien zu bilden.

4.4.3.1 Die Mutationen haben keinen Einfluss auf die Bildung und Keimungsfähigkeit von Konidien

Zur Bestimmung der Anzahl der Konidien wurden in 10 ml Weizen-Medium angezogene Konidien suspensionen (3.1.4) von je zwei Transformanden pro Mutante in drei Versuchsansätzen ausgezählt (3.6.5).

Alle Mutanten bildeten Konidien (**Abbildung 31A**), deren Morphologie sich nicht vom Wildtyp unterschied (nicht gezeigt). Die Anzahl der Konidien, die von virusinfiziertem Myzel des FgPH1, Fg Δ *pks12*, Fg Δ *hex-1*, Fg Δ *hex-1* und Fg Δ *so*^{2,3} abstammten, waren im Vergleich zum jeweiligen virusfreien Stamm jeweils um 65% bis 70% verringert (**Abbildung 31A, 1-4, 6**). Die Anzahl der Konidien, die vom virusinfizierten Fg Δ *so*^{0,4} abstammten, war im Vergleich zum virusfreien Stamm um 85% verringert (**Abbildung 31A, 5**). Die Anzahl der Konidien war demzufolge in den virusinfizierten Stämmen durchgehend signifikant ($p < 0.001$) reduziert.

Die Konidienproduktion innerhalb der virusfreien Mutanten (**Abbildung 31A, a**) und die Konidienproduktion innerhalb der virusinfizierten Mutanten (**Abbildung 31A, b**) unterschieden sich nicht signifikant.

Zur Bestimmung der Keimungsrate wurden von je zwei Transformanden je Mutante 250 Konidien vereinzelt und der Anteil der ausgekeimten Konidien bestimmt (3.6.5). Die statistische Auswertung erfolgte wie in 3.8 beschrieben. Die Keimungsraten aller Mutanten lag zwischen 97-98% und entsprach somit der Keimungsrate von FgPH1 mit 97,6% (**Abbildung 31B, 1**).

ERGEBNISSE

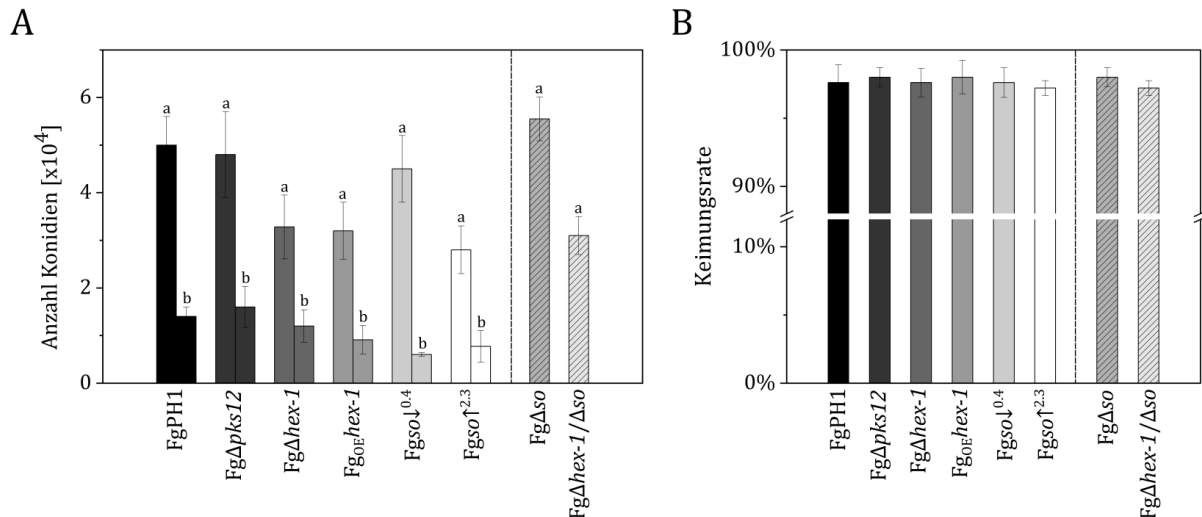


Abbildung 31: Konidienmenge und Keimungsrate. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes an. (A) Analyse der Konidienmenge, ausgezählt und berechnet. a= Konidien produziert aus virusfreiem Myzel. Alle Mutanten zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Konidienproduktion. b= Konidien produziert aus virusinfiziertem Myzel. Alle Mutanten zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Konidienproduktion. Signifikanter Unterschied ($p < 0.001$) zwischen a und b. (B) Analyse der Konidienkeimungsrate. Ausgezählt wurden 250 Konidien pro Stamm.

4.4.3.2 Die Bildung von Perithezien ist abhängig von SO aber nicht von Hex-1 oder einer Virusinfektion

Ascosporen werden bei der sexuellen Fortpflanzung gebildet und befinden sich bei *F. graminearum* in den Perithezien. Um zu untersuchen, ob alle Mutanten wie der Wildtyp (nicht gezeigt) die Fähigkeit besitzen Perithezien zu bilden, wurde jede Mutante in drei Wiederholungen auf Karottenagar (2.3) inkubiert (3.6.2).

Die Fg Δ pks12, Fg Δ hex-1, Fg_{OE}hex-1, und Fgso \uparrow ^{2.3} Mutanten bildeten sowohl in virusfreiem als auch virusinfiziertem Myzel nach 3-6 Wochen Perithezien. Die Fg Δ so und Fg Δ hex-1/ Δ so Mutanten bildeten keine Perithezien. Auch die Fgso \downarrow ^{0.4} Mutanten bildeten weder in virusfreiem noch in virusinfiziertem Myzel Perithezien (**Abbildung 32**).

ERGEBNISSE

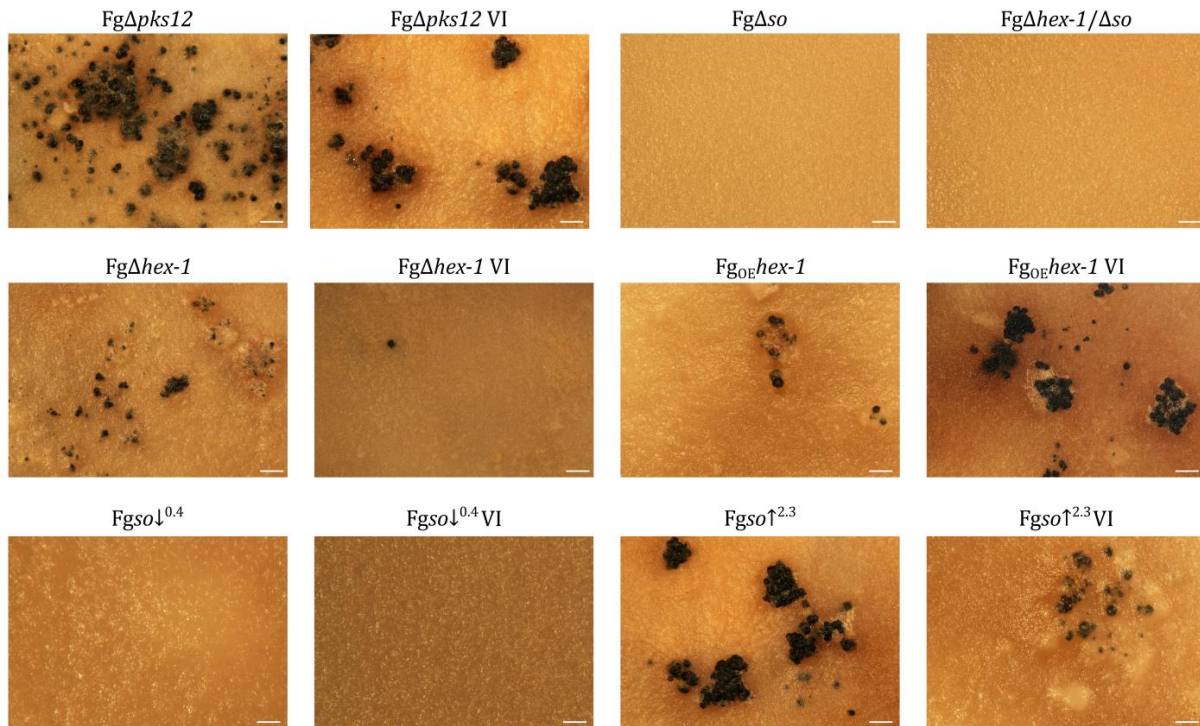


Abbildung 32: Perithezien der virusfreien und virusinfizierten *F. graminearum* Mutanten auf Karottenagar. Maßstab = 1 mm.

4.4.4 Wachstumstest der *F. graminearum* Mutanten

Das Wachstum von virusfreien und virusinfizierten *F. graminearum* Mutanten wurde jeweils auf CM Festmedium und auf Minimalmedium (2.3) verglichen. Für die Analyse der Mutanten, die SO unter Kontrolle des *Tcu* Promoters exprimieren, wurden diese sowohl auf Induktions-CM- (ICM, 2.3) als auch Minimalmedium ohne Kupfer (IMM, 2.3) angezogen, um sowohl die SO Überexpression als auch eine reduzierte SO Expression in die Untersuchung mit einzuschließen. Für die Untersuchung wurde in die Mitte der jeweiligen Platte ein Myzelblock angeimpft (3.1.1) und bei 28°C inkubiert. Das Wachstum wurde über 7 Tage nach Inokulation dokumentiert und die mit Myzel bewachsene Fläche vermessen und ausgewertet (3.6.1).

In **Abbildung 33** ist das Wachstum auf CM Festmedium von typischen virusfreien und virusinfizierten Mutanten (*FgPH1*, *FgΔpks12*, *FgΔhex-1*, *FgOEhex-1*, *Fgso*^{↓0.4} und *Fgso*^{↑2.3}) über 7 Tage gezeigt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zeigt **Abbildung 33G**.

Das Wachstum der virusfreien Mutanten zeigte keinen signifikanten Unterschied und vergrößerte sich von 122 mm² (1 dpi), auf 640 mm² (2 dpi), auf 2420 mm² (3 dpi) und auf 5280 mm² (4 dpi). Nach 7 Tagen waren die Platten von virusfreiem Myzel komplett bewachsen (=6400 mm²).

ERGEBNISSE

Das Wachstum der virusinfizierten Mutanten zeigte bei FgPH1, Fg Δ pks12, Fg Δ hex-1 und Fgso \uparrow ^{2.3} keinen signifikanten Unterschied und betrug 42 mm² (1 dpi), 120 mm² (2 dpi), 245 mm² (3 dpi), 440 mm² (4 dpi) und 1091 mm² (7 dpi). Fg Δ hex-1 zeigte 7 dpi ein leicht höheres Wachstum von 2061 mm². Virusinfizierte Fgso \downarrow ^{0.4} zeigten ab 2 dpi ein deutlich gesteigertes Wachstum (550 mm²), auf 835 mm² (3 dpi), auf 2718 mm² (4 dpi) und 7 dpi auf 6400 mm² (**Abbildung 33H**).

Das Wachstum unter Minimalbedingungen war insgesamt etwas verzögert, zeigte aber die gleichen Signifikanzen wie auf CM Festmedium. Einzelwerte der Wachstumsmessung unter Minimalbedingungen sind **Anhang 5** zu entnehmen.

Im Wachstumstest zeigte sich demnach eine signifikante Reduktion des Wachstums aller virusinfizierten Mutanten im Vergleich zu den virusfreien Mutanten ab dem ersten Tag. Fg Δ hex-1 zeigte an Tag 7 ein leicht höheres Wachstum als andere virusinfizierte Mutanten, wuchs im Vergleich zur virusfreien Fg Δ hex-1 Mutante aber dennoch stark reduziert (**Abbildung 33C**).

Die Mutante Fgso \downarrow ^{0.4} zeigte ein nur leicht reduziertes Wachstum im Vergleich zur virusfreien Mutante und ein stark erhöhtes Wachstum im Vergleich zu allen anderen virusinfizierten Mutanten (**Abbildung 33E**).

ERGEBNISSE

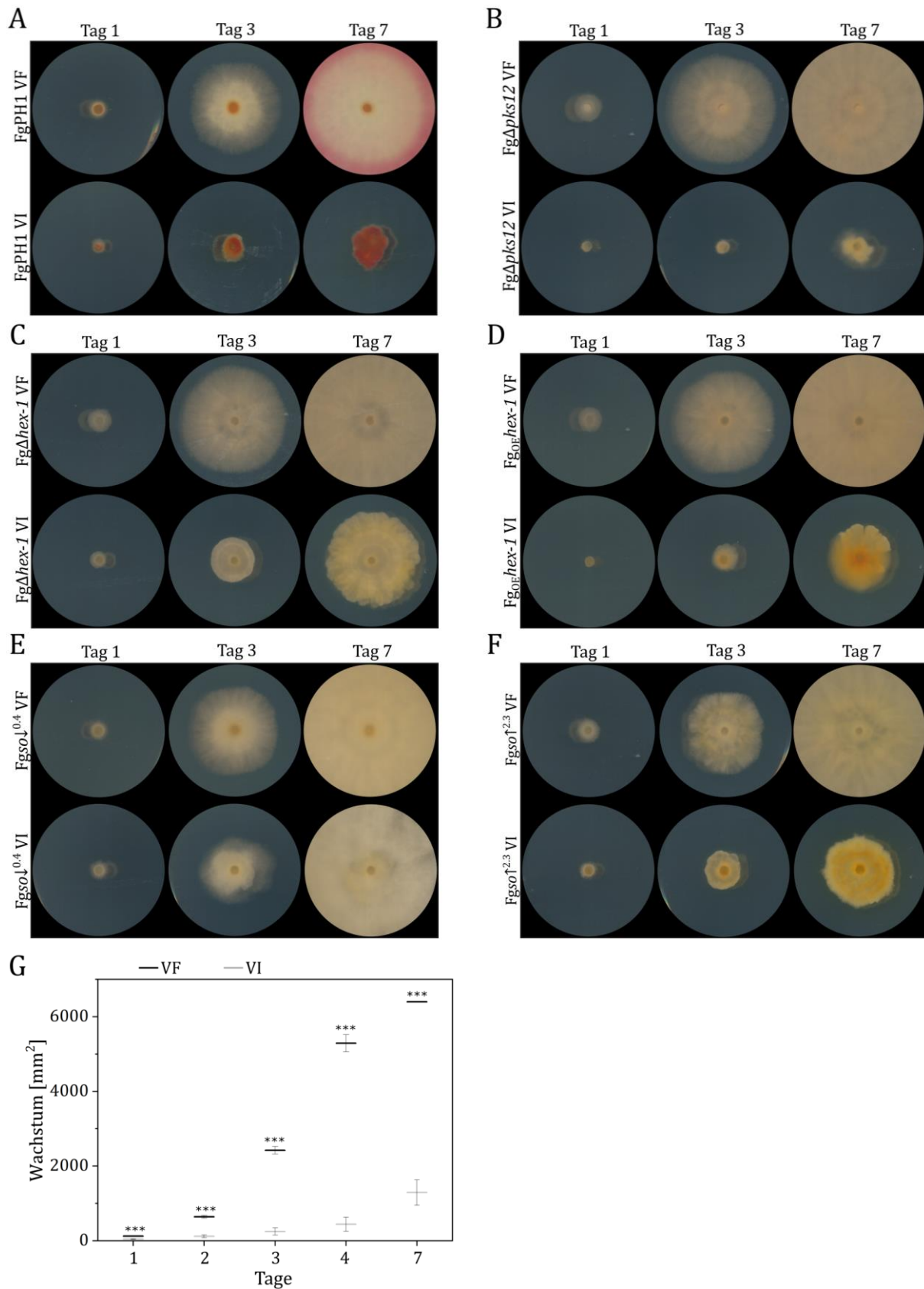


Abbildung 33: Wachstum des virusfreien und virusinfizierten Mutanten. (A) Vergleich des Phänotyps der virusfreien und virusinfizierten *FgPH1* Mutanten nach 1, 3 und 7 Tagen. (B) Vergleich des Phänotyps der virusfreien und virusinfizierten *FgΔpks12* Mutanten nach 1, 3 und 7 Tagen. (C) Vergleich des Phänotyps der virusfreien und virusinfizierten *FgΔhex-1* Mutanten nach 1, 3 und 7 Tagen. (D) Vergleich des Phänotyps der virusfreien und virusinfizierten *Fg_{OE}hex-1*

ERGEBNISSE

Mutanten nach 1, 3 und 7 Tagen. (E) Vergleich des Phänotyps der virusfreien und virusinfizierten $Fgso\downarrow^{0.4}$ Mutanten nach 1, 3 und 7 Tagen. (F) Vergleich des Phänotyps der virusfreien und virusinfizierten $Fgso\uparrow^{2.3}$ Mutanten n nach 1, 3 und 7 Tagen. (G) Wachstum aller virusfreien (schwarz) und virusinfizierten (grau) Mutanten. Gemessen wurde über 7 Tage. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes an. Signifikanzlevel sind wie folgt angegeben: $p < 0.001$ '***'.

Zur Kontrolle des Phänotyps und Wachstums der $Fgso\downarrow^{0.4}$ Mutante im Vergleich zu den *so*-Deletionsmutanten $Fg\Delta so$ und $Fg\Delta hex-1/\Delta so$ wurde in **Abbildung 34A** das Wachstum der drei virusfreien Mutanten über 7 Tage an typischen Beispielen auf CM Festmedium gegenübergestellt. Alle Mutanten wiesen ein vergleichbares Wachstum auf. Die Messungen der mit Myzel bewachsenen Fläche (**Abbildung 34B**) bestätigen diese Beobachtung. Die Unterschiede im Wachstum waren bei keinem Zeitpunkt signifikant. Das Wachstum unter Minimalbedingungen war insgesamt etwas verzögert, zeigte aber ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den *so*-Deletionsmutanten. Einzelwerte der Wachstumsmessung unter Minimalbedingungen sind dem **Anhang 5** zu entnehmen.

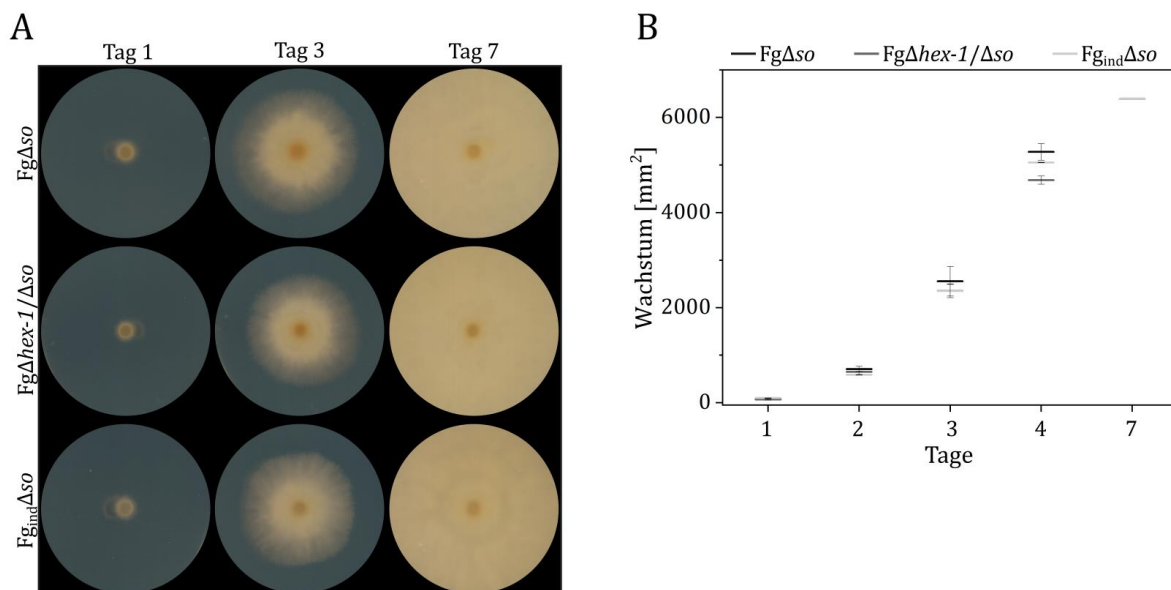


Abbildung 34: Vergleich des Wachstums der virusfreien $Fg\Delta so$, $Fg\Delta hex-1/\Delta so$ und $Fgso\downarrow^{0.4}$ über 7 Tage. (A) Vergleich des Phänotyps der Kolonien nach 1, 3 und 7 Tagen. (B) Mittleres radiales Wachstum der $Fg\Delta so$ (schwarz), $Fg\Delta hex-1/\Delta so$ (dunkelgrau) und $Fgso\downarrow^{0.4}$ (hellgrau) Kolonien. Gemessen wurde über 11 Tage. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes an. Signifikanzlevel sind wie folgt angegeben: $p > 0.05$ 'kein signifikanter Unterschied'.

Die *so*-Deletionsmutanten ($Fg\Delta so$, $Fg\Delta hex-1/\Delta so$ und $Fgso\downarrow^{0.4}$) zeigten im Vergleich zum $Fg\Delta pks12$ einen leicht veränderten Phänotyp (**Abbildung 35**). Myzel der *so*-Mutanten

ERGEBNISSE

zeigte Luftmyzel, welches an Watte erinnerte und nach ca. 21 Tagen in sich zusammenbrach. Die *Fgso*^{↓0.4} Mutante zeigte vermehrt watteartiges Myzel, aber auch teilweise Bereiche, die dem Phänotyp der *FgΔpks12* Mutante glichen. Die übrigen Deletionsmutanten zeigten untereinander keine Unterschiede im Aussehen des Luftmyzels.

Alle Mutanten in denen *SO* deletiert oder reduziert wurde, zeigten einen im Verhältnis zum Wildtyp leicht veränderten Phänotyp. Die Wachstumseigenschaften aller Mutanten waren mit denen der *FgΔpks12* Mutante und der *FgPH1* Kontrolle vergleichbar. Nur die virusinfizierte *Fgso*^{↓0.4} Mutante zeigte ein signifikant weniger eingeschränktes Wachstum im Vergleich zu allen anderen virusinfizierten Mutanten.

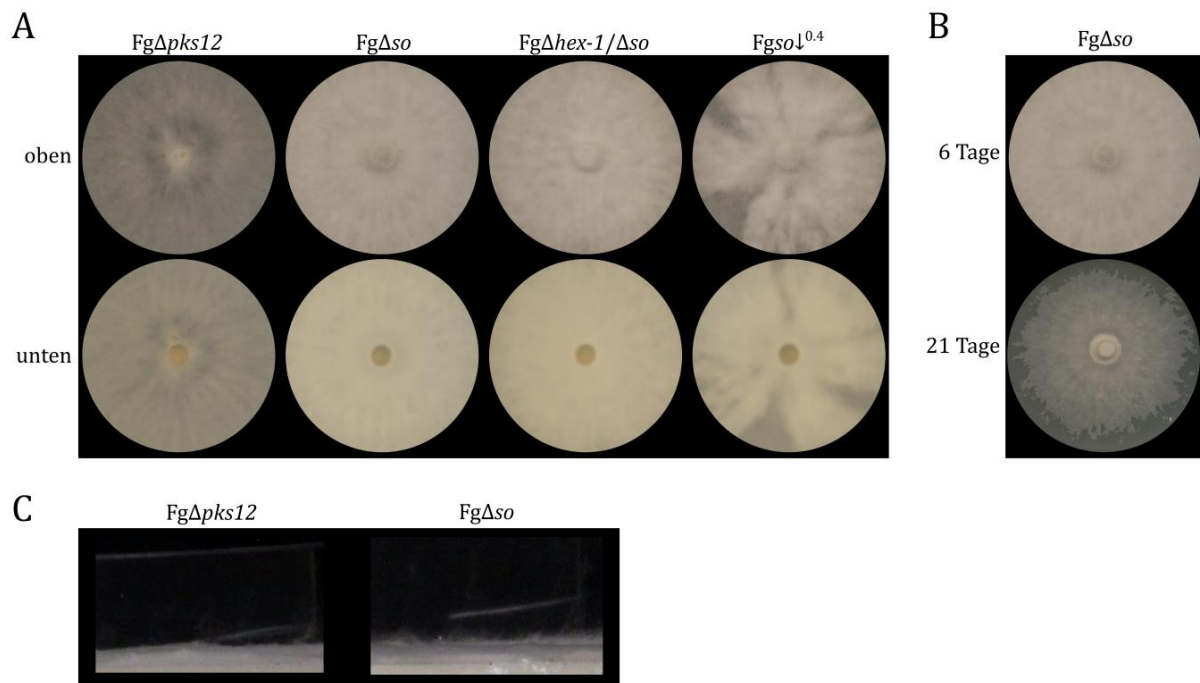


Abbildung 35: Phänotypische Analyse der *SO*-Mutanten (A) Ober- und Unteransicht des Myzels der *SO*-Mutanten und *FgΔpks12* nach 6 Tagen bei 28°C. (B) Phänotyp von *FgΔso* nach 6 Tagen und nach 21 Tagen bei 28°C. (C) Querschnitt der *FgΔpks12* und *FgΔso* Mutante. Analyse der Mutanten nach Inkubation auf CM-Festmedium nach 6 Tagen bei 28°C.

4.4.5 Ein deletiertes oder herabreguliertes *so* Gen aber nicht eine *Hex-1*-Deletion führt zu einer verminderten Infektiosität

Es wurde überprüft, in welchem Ausmaß *Hex-1* und *SO* die Infektion ihres natürlichen Wirtes - *Triticum aestivum* – beeinflussen (2.2.3). Dazu wurden Ährchen mit Konidien der jeweiligen Mutante inokuliert (3.6.3). Es wurde das Verhältnis von infizierten und nicht infizierten Ährchen je Ähre betrachtet. Die statistische Auswertung erfolgte wie in 3.8 beschrieben.

ERGEBNISSE

Für die virusfreie FgPH1 Kontrolle ergab sich eine durchschnittliche Infektionsrate von 81% und für Fg Δ pks12 von 90%. Die Infektionsraten von Fg Δ hex-1 und Fg_{OE}hex-1 zeigten keinen signifikanten Unterschied zur FgPH1 Kontrolle und lagen für Fg Δ hex-1 bei 70% und für Fg_{OE}hex-1 bei 76%. Ebenfalls zeigte Fgso^{↑2.3} keinen signifikanten Unterschied mit einer Infektionsrate von 87%. Im Gegensatz dazu waren die Infektionsraten immer dann signifikant verringert, und ähnelten der Infektionsrate des virusinfizierten Wildtyps (10 %), wenn so deletiert oder herabreguliert war. So variierten die Infektionsraten von 19% für Fgso^{↓0.4} über 16% für Fg Δ so zu 9% für Fg Δ hex-1/ Δ so (**Abbildung 36B**).

Alle virusinfizierten Mutanten unterschieden sich in ihrer Infektionsrate nicht von der der virusinfizierten Kontrolle FgPH1 (**Abbildung 36B**).

Da die Infektion der Mutanten Fg Δ so, Fg Δ hex-1/ Δ so und Fgso^{↓0.4} wie die virusinfizierte FgPH1 Kontrolle meist auf das inokulierte Ährchen beschränkt war (**Abbildung 36A, weiße Dreiecke**), wurde im Folgenden die Ausbreitung des Myzels innerhalb der Ähre sowie die Fähigkeit zur Bildung von Infektionsstrukturen untersucht.

ERGEBNISSE

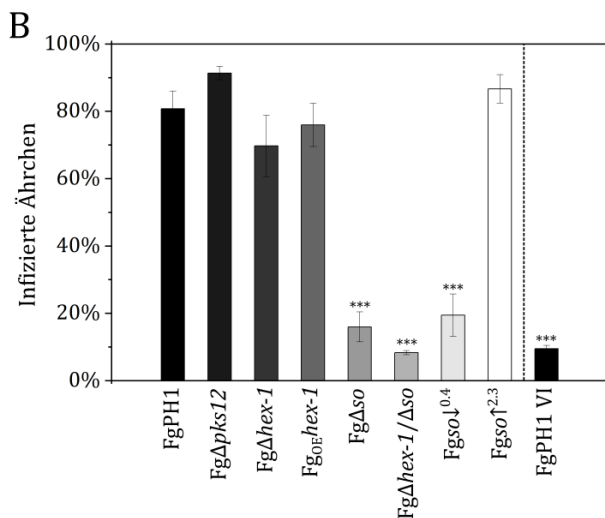
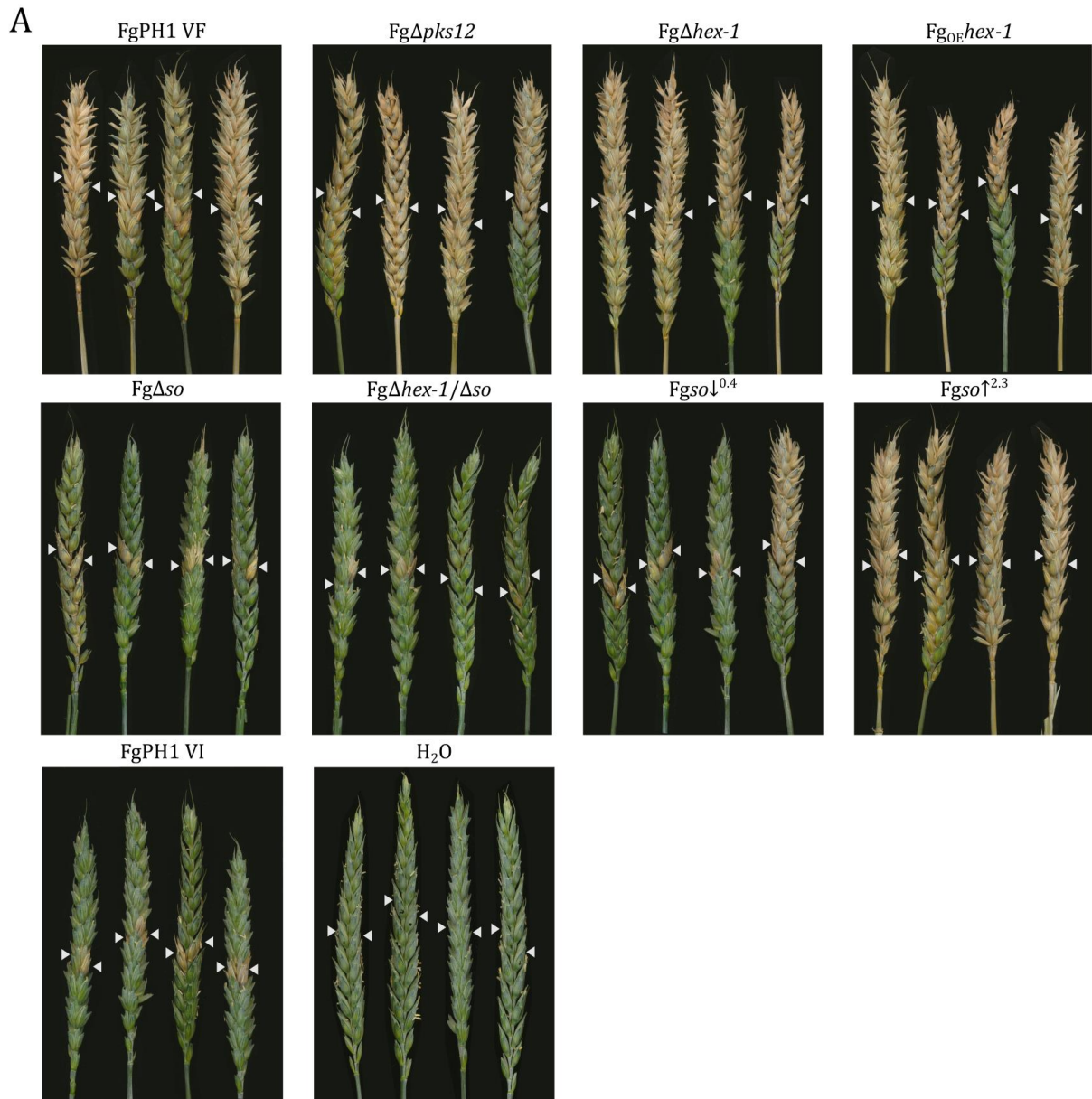


Abbildung 36: Schadbilder und Infektionsraten der virusfreien Mutanten auf *Triticum aestivum*. (A) Schadbilder von Weizenähren 21 dpi. Als Kontrollen dienten virusinfizierte und virusfreie FgPH1. Als Negativkontrolle wurde mit Wasser inokuliert. Weiße Dreiecke markieren die inokulierten Ährchen. (B) Statistische Analyse der Infektionsraten. Als Kontrollen dienten

ERGEBNISSE

virusinfizierte und virusfreie FgPH1. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes an. Signifikanzlevel sind wie folgt angegeben: $p < 0.001$ '***', $p > 0.05$ 'kein signifikanter Unterschied'.

4.4.5.1 Mutanten mit reduziertem oder fehlendem *so* zeigen eine verlangsamte Ausbreitung innerhalb der Weizenähre

Die Ausbreitung des Myzels über die inokulierte Ähre hinaus wurde in Längsschnitten von Ähren detektiert (3.6.3).

Zunächst wurde die Ausbreitung des Myzels der virusfreien FgPH1 Kontrolle und von Fg Δ *pks12* untersucht. Der Wildtyp FgPH1 hatte sich nach 8 Tagen über das inokulierte Ährchen hinaus ausgebreitet und das Gewebe vollständig nekrotisiert. Myzel von Fg Δ *pks12* zeigte eine zur Positivkontrolle vergleichbare Ausbreitung in der Ähre. Nach 12 Tagen hatte sich das Myzel von FgPH1 und Fg Δ *pks12* in der Ähre fast vollständig ausgebreitet. (**Abbildung 37**).

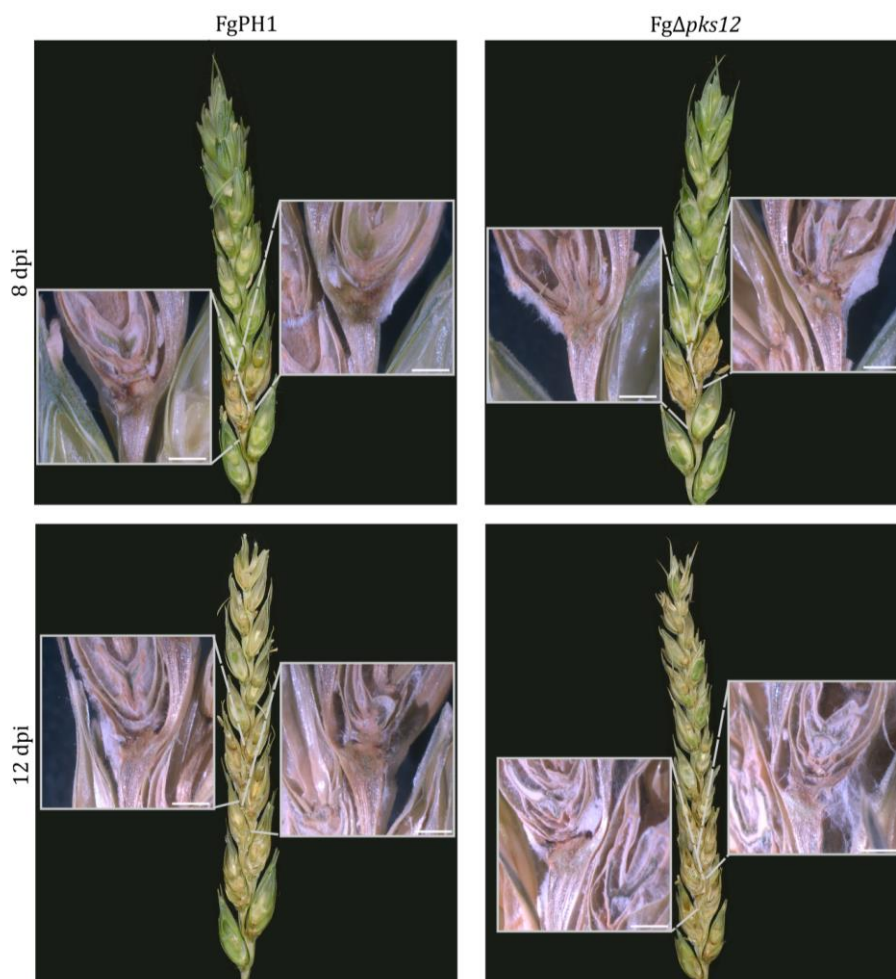


Abbildung 37: Längsschnitte von mit FgPH1 und Fg Δ *pks12* infizierten Ähren. Gezeigt sind Ähren 8 dpi und 12 dpi. Der Maßstab der mit dem Stereomikroskop aufgenommenen Bilder beträgt 2 mm. Infiziertes Gewebe ist braun, gesundes Gewebe grün.

ERGEBNISSE

Die Ausbreitung der virusinfizierten FgPH1 Kontrolle zeigte nach 8 und 12 Tagen nekrotisches Gewebe über dem Rachisknoten. Unterhalb des Rachisknotens war kein nekrotisches Gewebe und somit keine Infektion erkennbar (**Abbildung 38**). Die Wasserkontrolle zeigt zu keinem Zeitpunkt nekrotisches Gewebe oder Anzeichen einer Infektion (**Abbildung 38**).

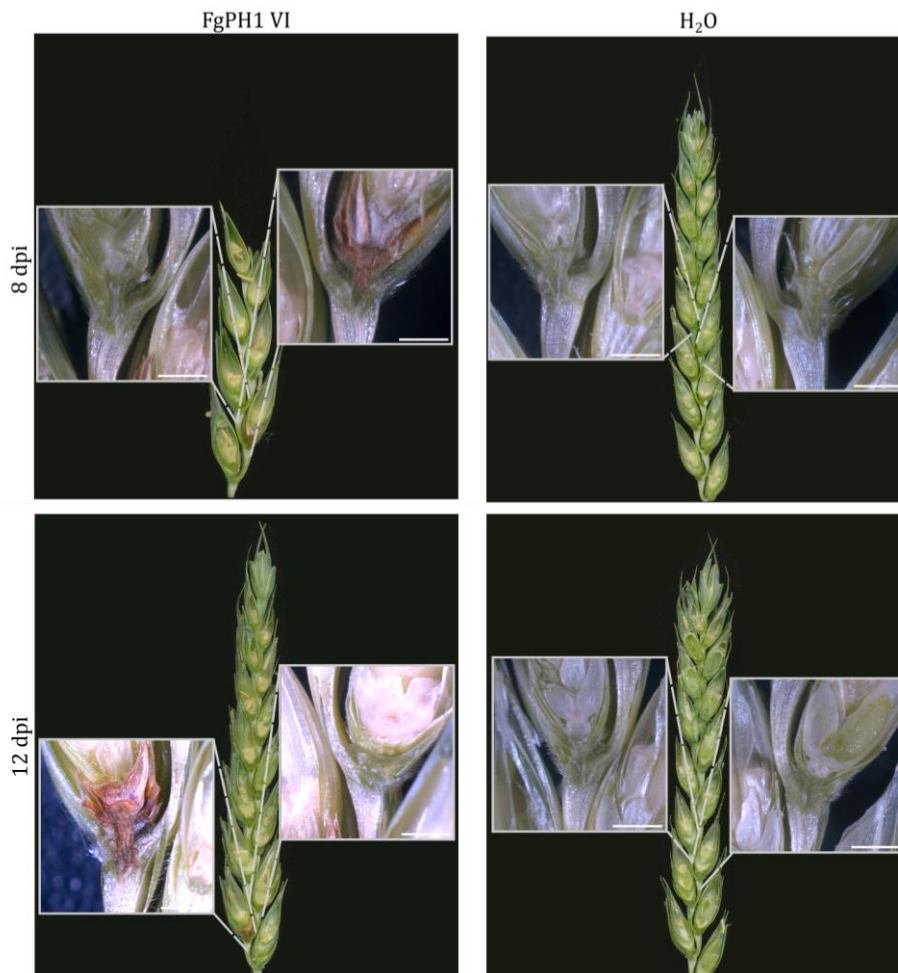


Abbildung 38: Längsschnitte von mit virusinfiziertem FgPH1 und Wasser inokulierten Ähren. Gezeigt sind Ähren 8 dpi und 12 dpi. Der Maßstab der mit dem Stereomikroskop aufgenommenen Bilder beträgt 2 mm. Infiziertes Gewebe ist braun, gesundes Gewebe grün.

Anschließend wurde die Ausbreitung des Myzels der *hex-1* Deletions- und Überexpressionsmutante untersucht. Die *FgΔhex-1* Mutante zeigte nach 8 Tagen oberhalb des Rachisknotens bereits stark nekrotisches Gewebe, in die Rachis hatte sich die Infektion aber noch nicht ausgebreitet (**Abbildung 39**). Nach 12 Tagen hatte die Infektion das erste Ährchen über den Rachisknoten verlassen und die nächsten Ährchen infiziert. Die *Fg_{OE}hex-1* Mutante zeigte nach 8 Tagen oberhalb des Rachisknotens und in der Rachis nekrotisches Gewebe (**Abbildung 39**). Nach 12 Tagen hatte sich die Infektion in der Hälfte der Ährchen ausgebreitet.

ERGEBNISSE

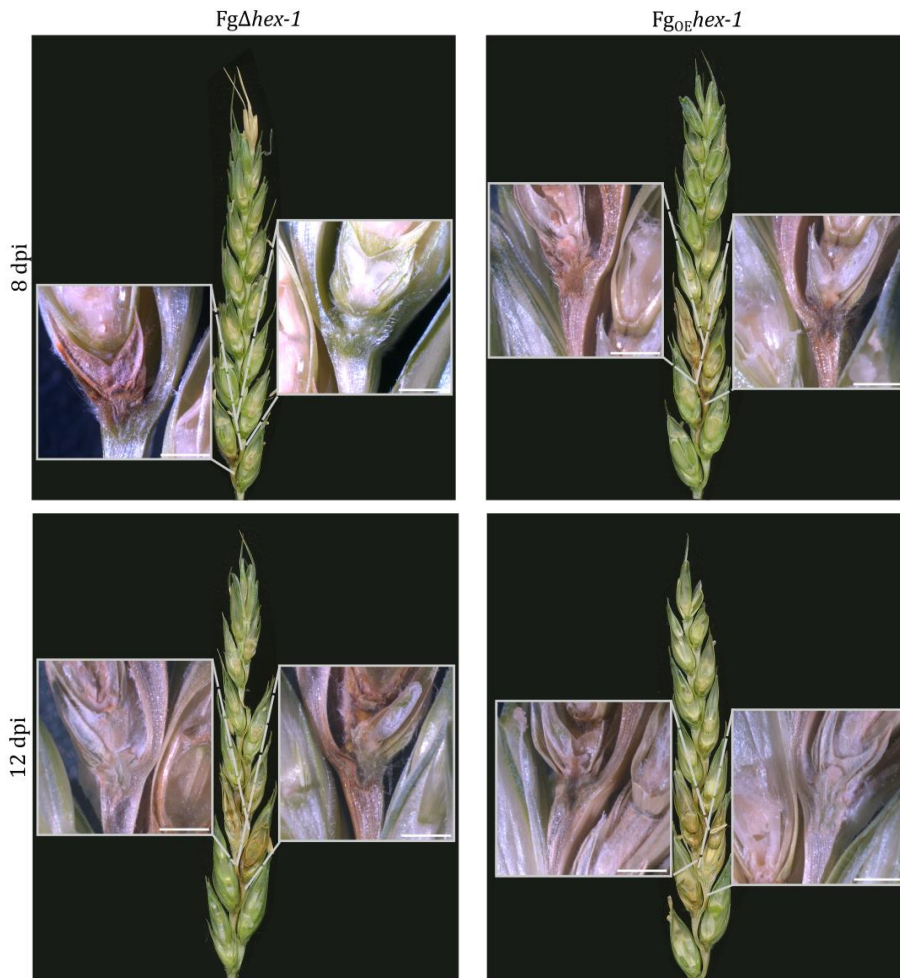


Abbildung 39: Längsschnitte von mit *Fg* Δ *hex-1* und *Fg*_{OE}*hex-1* infizierten Ähren. Gezeigt sind Ähren 8 dpi und 12 dpi. Der Maßstab der mit dem Stereomikroskop aufgenommenen Bilder beträgt 2 mm. Infiziertes Gewebe ist braun, gesundes Gewebe grün.

Die Ausbreitung des Myzels in den *so*-Deletionsmutanten *Fg* Δ *so* und *Fg* Δ *hex-1*/ Δ *so* zeigten nach 8 Tagen oberhalb des Rachisknotens teilweise nekrotisches Gewebe (**Abbildung 40**). Nach 12 Tagen hatte die Infektion das erste Ährchen über den Rachisknoten in die Rachis verlassen.

ERGEBNISSE

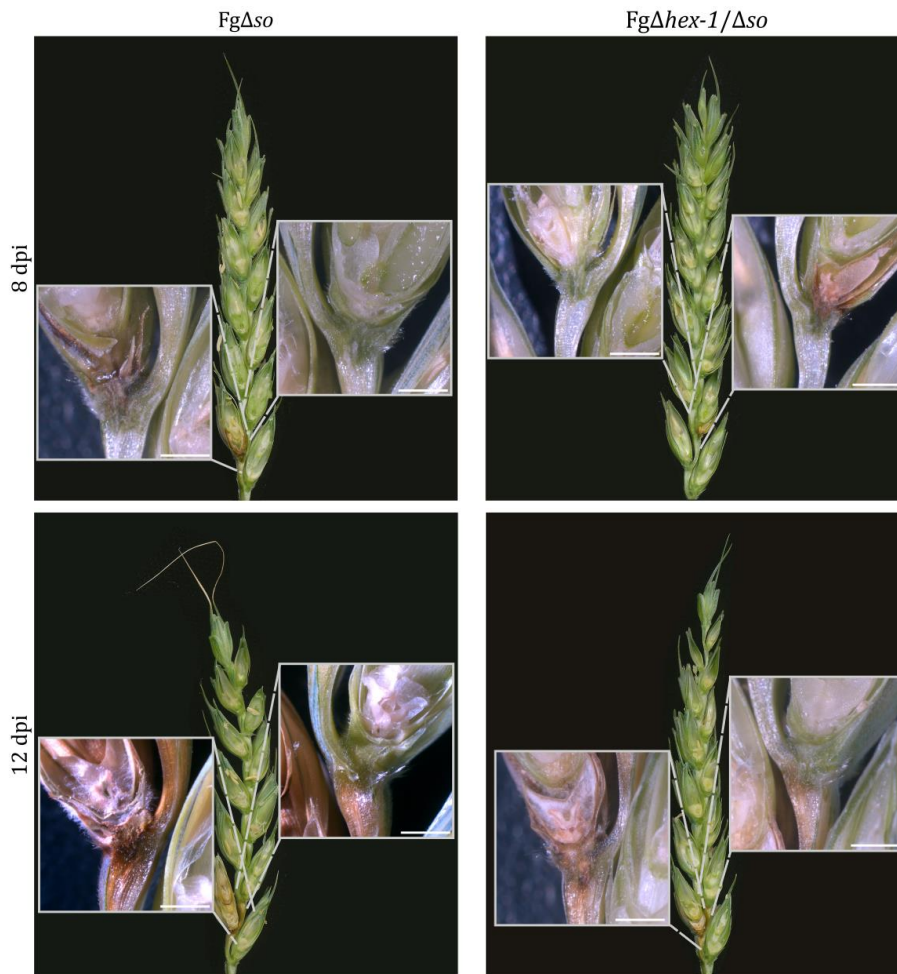


Abbildung 40: Längsschnitte von mit *FgΔso* und *FgΔhex-1/Δso* infizierten Ähren. Gezeigt sind Ähren 8 dpi und 12 dpi. Der Maßstab der mit dem Stereomikroskop aufgenommenen Bilder beträgt 2 mm. Infiziertes Gewebe ist braun, gesundes Gewebe grün.

Inokulationen mit *Fgso*^{↓0.4} zeigten nach 8 Tagen oberhalb des Rachisknotens teilweise nekrotisches Gewebe (**Abbildung 41**). Nach 12 Tagen hatte Myzel sich über den Rachisknoten des ersten Ährchen in die Rachis ausgebreitet, weitere Ährchen zeigten aber keine Anzeichen einer Infektion. Die Inokulationen mit *Fgso*^{↑2.3} hatten sich nach 8 Tagen über das inokulierte Ährchen in die Rachis ausgebreitet und das Gewebe nekrotisiert (**Abbildung 41**). Nach 12 Tagen zeigten die Hälfte der Ährchen Symptome der Ährenbleiche.

ERGEBNISSE

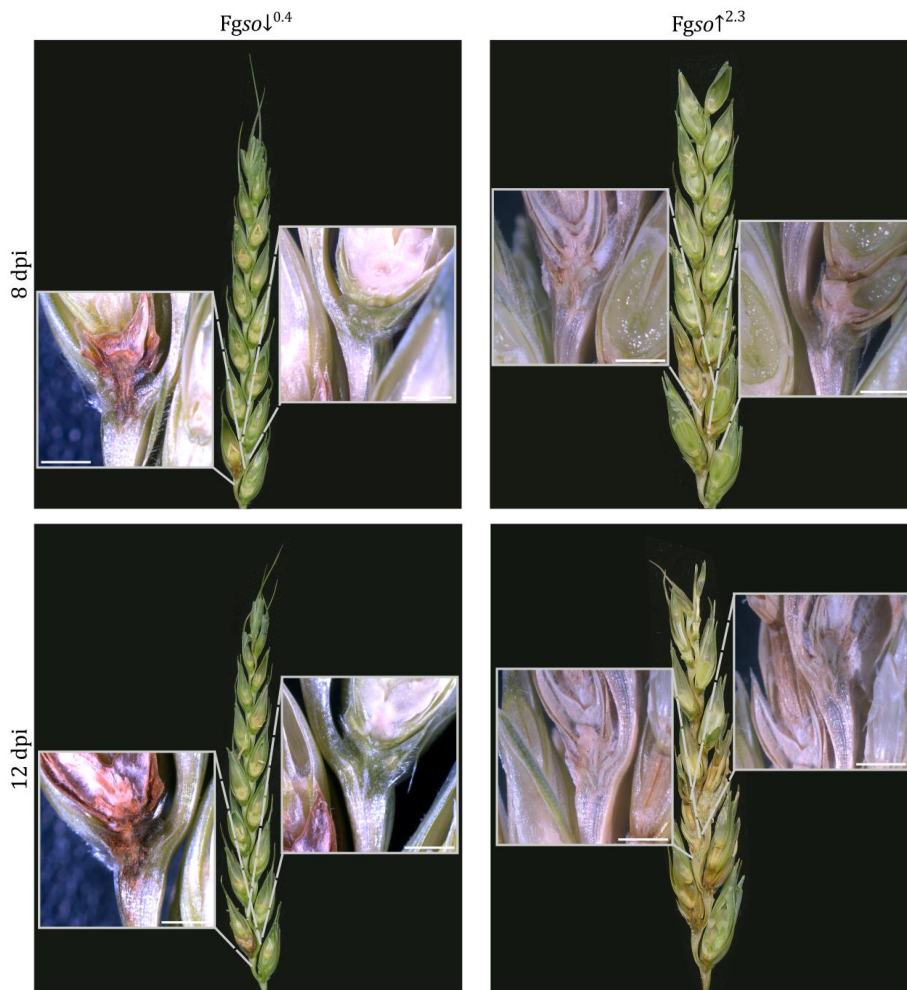


Abbildung 41: Längsschnitte von mit $Fgso^{\downarrow 0.4}$ und $Fgso^{\uparrow 2.3}$ infizierten Ähren. Gezeigt sind Ähren 8 dpi und 12 dpi. Der Maßstab der mit dem Stereomikroskop aufgenommenen Bilder beträgt 2 mm. Infiziertes Gewebe ist braun, gesundes Gewebe grün.

Das Myzel der virusfreien FgPH1 Kontrolle und Fg Δ pks12 zeigten eine vergleichbare Ausbreitungsgeschwindigkeit in der Ähre und hatten sich nach 12 Tagen in der Ähre fast vollständig ausgebreitet. Myzel von Fg Δ hex-1 und Fgso^{↑2.3} zeigten ebenfalls eine vergleichbare Ausbreitungsgeschwindigkeit und hatten sich nach 12 Tagen in der Hälfte der Ährchen ausgebreitet. Fg Δ hex-1 zeigte im Vergleich zu den Überexpressionsmutanten eine leicht verzögerte Ausbreitung. Alle so-Deletionsmutanten (Fg Δ so, Fg Δ hex-1/ Δ so und Fgso^{↓0.4}) zeigten eine starke Reduktion in der Geschwindigkeit der Ausbreitung. Insgesamt waren alle Mutanten in der Lage, den Rachisknoten zu überwinden und über die Rachis weitere Ährchen zu infizieren.

4.4.5.2 In Infektionen mit Mutanten mit reduziertem oder fehlendem SO werden weniger Infektionsstrukturen gebildet

Zur Analyse der Infektionsstrukturen wurden gerade erblühte Weizenährchen (2.2.3) mit Konidien der *F. graminearum* Mutanten inokuliert und für 6 Tage inkubiert (3.6.4).

Bei allen Mutanten wurden Infektionskissen 6 Tage nach Inokulation gebildet, wobei durchgehend weniger Infektionskissen in den Deletionsmutanten *FgΔhex-1*, *FgΔhex-1/Δso*, *FgΔso* und *Fgso*^{↓0.4} zu beobachten waren. Beispiele von Infektionsstrukturen sind mit weißen Dreiecken gekennzeichnet. Bei Infektionen von Mutanten mit reduziertem oder nicht vorhandenem SO wurden nur vereinzelte Infektionskissen gebildet. Die Überexpressionsmutanten und die *FgΔpks12* Mutante zeigten vergleichbar viele Infektionsstrukturen vergleichbar mit der FgPH1 Kontrolle. Die virusinfizierte FgPH1 Kontrolle zeigte im Ährchen ebenfalls vergleichbar viele Infektionsstrukturen wie die virusfreie FgPH1 Kontrolle (**Abbildung 42**).

ERGEBNISSE

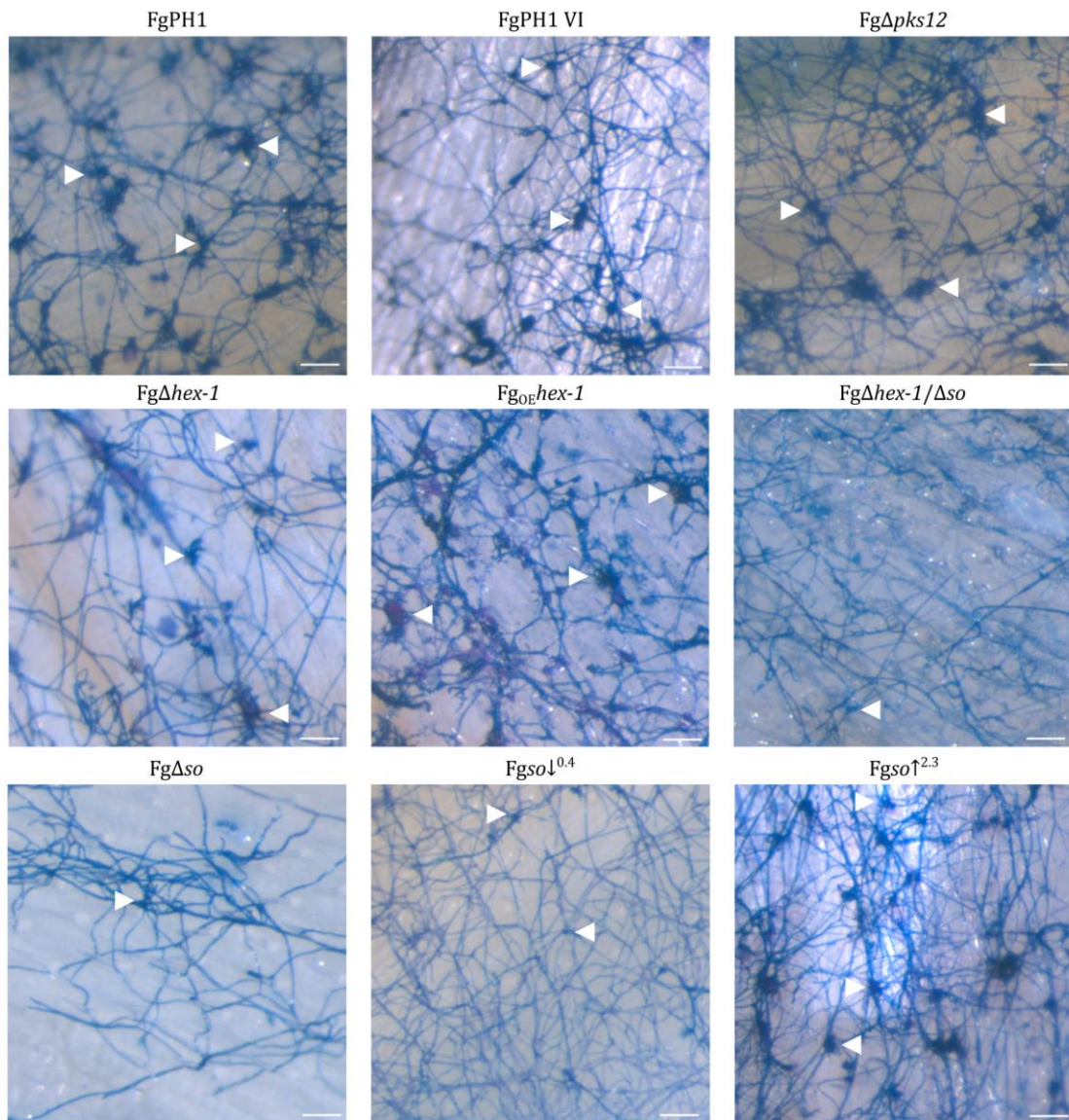


Abbildung 42: Infektionsstrukturen der *F. graminearum* Mutanten und FgPH1 im inokulierten Ährchen 6 dpi Das Myzel wurde mit 0.1% (w/v) Tryphanblau gefärbt. Maßstab = 100 μm.

5. Diskussion

Das *Fusarium graminearum* Virus China 9 verursacht in *F. graminearum* eine starke Hypovirulenz (Darissa *et al.*, 2012) und könnte ähnlich wie das CHV1 als Biozid eingesetzt werden. Doch wird CHV1 direkt über virusinfiziertes Myzel auf Wunden befallener Kastanienstämme inokuliert und verbreitet sich innerhalb des Bestandes selbstständig über Anastomosen (Heiniger, 2007; Nuss, 1992). Das Ausbringen über virusinfiziertes Myzel ist für mehrjährige, einzelne Bäume, aber nicht für einjährige Nutzpflanzen möglich. Eine alternative Applikation von FgV-ch9 als Biozid im Feld ist das Ausbringen von virusinfizierten Konidien. Konidien können im industriellen Maßstab produziert werden, das Ausbringen erfordert minimale Adaptionen an landwirtschaftlichen Geräte und ist zeitunabhängig möglich (Weber *et al.*, 1999). Konidien verbleiben in der resistenten Sporenform bis die Umweltbedingungen für das Auskeimen günstig sind. Nach dem bisherigen Stand der Forschung scheiterte das Ausbringen von Konidien daran, dass diese nur zu einem geringen Anteil zu hypovirulentem Myzel auskeimten (C. Heinze, Universität Hamburg, nicht publiziert). Ähnliches konnte auch bei anderen Virus/Wirt Kombinationen beobachtet werden (Hillman & Suzuki, 2004; Lee *et al.*, 2014). In dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass der intra- und interzelluläre Transport für die Infektion der Konidien verantwortlich sein könnte. Hierfür wurden zwei Proteine untersucht, das Hex1 und das SO, die als septale Proteine für einen regulierten Transport des Virus in die Konidien verantwortlich sein könnten. Beide Proteine sind mit den Poren in der Wirtszelle assoziiert.

Eine Deletion, oder womöglich auch Überexpression, könnte demnach zu einem verbesserten Transport von Virus in die Konidien führen. Die damit einhergehende Veränderung des pilzlichen Genoms darf für einen Einsatz in der Praxis aber wiederum nicht dazu führen, dass kaum oder keine Konidien mehr produziert werden können oder die Pilze in Ihrer Infektiosität erhöht sind. Daher wurde die Pathogenität aller virusinfizierten Mutanten auf ihren natürlichen Wirt - *Triticum aestivum* – untersucht. Alle virusinfizierten Mutanten konnten den Rachisknoten des inokulierten Ährchens nicht überwinden (**Abbildung 36**) und zeigten damit den typischen virusinfizierten Phänotyp (Darissa *et al.*, 2012). Die Unfähigkeit zur Bildung von Ascosporen hingegen könnte für die Biosicherheit förderlich sein, da sich das System so nicht unkontrolliert über eine Vegetationsperiode hinaus ausbreiten kann. Weiterhin müssen die Viren in der Lage sein, in den mutierten Wirten replizieren und von diesen über Anastomosen auf Wildisolate übertragen werden zu können.

5.1 Virus ist ungleich im Myzel verteilt

Unabhängige Infektionen des Wildtyps mit jeweils demselben Donor zeigten starke Schwankungen in der Viruskonzentration. Auch innerhalb eines infizierten Myzels konnten unterschiedliche Viruskonzentrationen detektiert werden (**Abbildung 25**).

Von Yeagashi *et al.* wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich Mykoviren passiv im Zytoplasma in Richtung des Hyphenwachstums mit dem zytoplasmatischen Fluss bewegen (Yaegashi *et al.*, 2011). Die Verteilungsmuster von dsRNA innerhalb einer Kultur wurden von Yaegashi *et al.* (2011) für vier Viren in *Rosellinia necatrix* beobachtet. Diese verteilten sich jeweils über die gesamte Kultur, aber akkumulierten eher in peripheren Regionen oder die Akkumulation von viraler dsRNA folgte keinem spezifischen Muster und war sehr ungleich mit großen Konzentrationsschwankungen in den Kulturen verteilt. Martin & van Alfen (1991) fanden eine bis zu vierfach schnellere Ausbreitung von viraler dsRNA als es ein passiver Transport im zytoplasmatischen Strom zulassen würde.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Viren sich doch nicht nur passiv im zytoplasmatischen Strom bewegen, sondern dass die Verteilung und Ausbreitung auch von anderen Faktoren beeinflusst wird. Mögliche Faktoren könnten der Transport von dsRNA über pilzliche Vesikel oder eine Co-Infektion mit einem weiteren Virus sein (Hansen *et al.*, 1985; Yaegashi *et al.*, 2011). Des Weiteren erscheint es möglich, dass eine Regulation der Verteilung an bestimmten pilzlichen Strukturen wie den septalen Poren erfolgt. Eine weitere Möglichkeit für eine gezielte Ausbreitung und Verteilung könnten virale Proteine sein, die ähnliche Funktionen wie *movement* Proteine in Pflanzenviren ausüben. Obwohl die meisten Mykoviren eng mit Pflanzenviren verwandt sind, konnte bis jetzt für kein Mykovirus ein *movement* Protein identifiziert werden (Donaire *et al.*, 2016; Ghabrial, 1998). Auch die Interaktionen mit Wirtsfaktoren oder unterschiedliche wirtseigene Abwehrmechanismen könnten einen Einfluss auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit und das Verteilungsmuster haben.

Überraschenderweise konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an virusinfizierten Konidien von Myzel mit hoher Viruslast geringer war als von Myzel mit geringer Viruslast (**Abbildung 27**). Dies könnte auf einen der wichtigsten antiviralen Abwehrmechanismus, die RNA-Interferenz (RNAi) zurückzuführen sein. Möglicherweise könnte die RNAi durch die Konzentration viraler RNA beeinflusst werden. Höhere virale Konzentrationen führten dann zu einer stärkeren RNAi Antwort, die in einer effektiveren Unterdrückung

DISKUSSION

der viralen Replikation endet und es dem Virus so erschwert, sich weiter auszubreiten. In *F. graminearum* wurden für dieses System zwei Dicer, zwei Argonaute-Proteine, ein mit den Argonauten Proteinen interagierendes Protein, eine Helicase und vier RdRPs identifiziert, welche an der Unterdrückung der viralen Replikation beteiligt waren (Gaffar *et al.*, 2019).

Um trotz *gene silencing* eine virale Infektion zu etablieren, exprimieren die meisten Viren *gene silencing* Supressoren. In Mykoviren konnten bisher einige Proteine mit *gene silencing* Funktion identifiziert werden. So zeigten das P29 Protein des Hypovirus CHV1, und das P32 des Rosellina Necatrix Mycoreovirus 3 *gene silencing* Funktionen (Segers *et al.*, 2006; Yaegashi *et al.*, 2013).

Auch FgV-ch9 exprimiert ein Protein mit *gene silencing suppressor* Funktion. Das Protein P5 verfügt über sechs C2H2-Zinkfinger-Domänen (Blum *et al.*, 2017). Solche Domänen binden in erster Linie an dsRNA (Yang *et al.*, 1999). Blum (2017) spekulierte, dass dieses Protein siRNA bindet ähnlich wie das P19 des Tomatenzwergbusch-Virus, das des Pothos Latent Virus oder das P14 des Benyvirus (Chiba *et al.*, 2013; Mérai *et al.*, 2005; Ye *et al.*, 2003).

Möglicherweise kann das P5 des FgV-ch9 nur effektiv siRNAs binden, solange die Viruskonzentration im Wirt einen bestimmten Schwellenwert nicht überschreitet. Andernfalls könnte es zu einem massiven Anstieg der *gene silencing* Aktivität und einer gleichzeitigen Herabregulation von P5 kommen, die die Replikation und damit den Virustiter herabsetzt und nach der Hypothese von Hollings & Stone (1969) damit die Übertragungswahrscheinlichkeit mindert. Dies könnte erklären, wie es zu den unterschiedlichen Virustitern in Myzel und Konidien kommt. Das Gelbverzweigungsvirus zeigte beispielsweise bei einer reduzierten Viruskonzentration eine im Vergleich zu einer hohen Viruskonzentration reduzierte Ausbreitung von infizierten auf gesunde Pflanzen. Auch für das Ackerbohnenwelke-Virus 1 konnten ähnliche Effekte gezeigt werden (Ferriol *et al.*, 2013; Gray, 1991).

Da virale dsRNA meist nur im Partikel vorhanden ist, könnten *gene silencing* Supressoren bei der Replikation von dsRNA Viren nur eine untergeordnete Rolle spielen und andere Mechanismen zur Bekämpfung der pilzlichen Abwehr könnten einen größeren Einfluss auf die Ausbreitung und Verteilung von Viren in Pilzen haben. Untersuchungen hierzu sind allerdings noch nicht vorhanden.

DISKUSSION

Wie bereits erwähnt, wurden bei FgV-ch9/*F. graminearum* aus Myzel mit einer niedrigen Viruskonzentration überraschend mehr Konidien erhalten, die zu Myzel mit einem hypovirulenten Phänotyp auskeimten als bei Myzel mit einer hohen Viruskonzentration. Dies verhält sich gegenläufig zu Publikationen, die sich bereits mit der Charakterisierung virusinfizierter Konidien bei anderen Virus/Wirt Kombinationen beschäftigt haben. Demarini *et al.* (1977) spekulierten, dass Viruspartikel während der Konidiogenese in den Phialiden vorhanden sein müssen, um in Konidien gelangen zu können. Die zytoplasmatische Verbindung zwischen Phialide und Konidien wird nur Minuten nach deren Bildung durch das Verschließen der septalen Pore getrennt. Daher können Konidien, gebildet von der gleichen Phialide, eine unterschiedliche Anzahl an Viruspartikeln aufweisen. Weitere Studien bestätigten, dass eine direkte Korrelation zwischen der Akkumulation von viraler RNA und dem Vermögen in Konidien einzuwandern besteht (Suzuki *et al.*, 2003). Die Wahrscheinlichkeit, dass virale RNA oder Viruspartikel über die Konidiophoren und Phialiden in die Konidien gelangen können, steigt demnach wahrscheinlich mit der Konzentration von Viruspartikeln im Myzel an. Mutmaßlich reicht es aber aus, wenn eine höhere Konzentration von Viruspartikeln in den Bereichen des Myzels vorliegt, in denen Konidiophoren gebildet werden. So kommt es eventuell zu einem Verteilungsmuster, indem sich virale RNA oder Viruspartikel in Kompartimenten in denen Konidiophoren gebildet werden akkumuliert während in anderen Bereichen des Myzels eine nur geringe Viruskonzentration vorhanden ist.

In dieser Arbeit wurden Viruskonzentrationen berechnet und mit hypovirulenten Phänotypen korreliert. Anhand dieser Ergebnisse ist zu erkennen, dass eine geringere Viruskonzentration zu einem weniger hypovirulenten Phänotyp führt. Es ist also möglich, dass eine geringere Viruskonzentration eine verminderte Immunantwort auslöst, die sich wiederum positiv auf die Übertragung von Viruspartikeln in Konidien auswirken könnte. Eine Strategie des Virus könnte sein, in Bereichen des Myzels, in denen Konidiophoren gebildet werden, eine höhere Akkumulation von viraler RNA bzw. Viruspartikeln zu erreichen und in anderen Bereichen des Myzels durch eine geringe Viruskonzentration die wirtseigene Immunantwort zu unterdrücken.

Es ist davon auszugehen, dass sich Viruspartikel oder virale RNA nicht nur passiv ausbreiten, sondern die Ausbreitung und Verteilung von verschiedenen Faktoren beeinflusst werden. Anhand der generierten Ergebnisse liegt der Schluss nah, dass die Ausbreitung und Verteilung einem komplexen und mehrschichtigen Mechanismus unterliegt und dessen Effektivität auch von der Fähigkeit beeinflusst wird, das pilzliche

DISKUSSION

Abwehrsystem zu umgehen. Dies könnte beispielsweise durch ein bestimmtes Verteilungsmuster innerhalb des Myzels erfolgen. Viruskonzentrationen im Myzel einzelner Kulturen unterliegen Schwankungen. Diese sind möglicherweise auf die Kompartimentierung zur Bildung von Konidiophoren zurückzuführen. Weitere Versuche müssen jedoch durchgeführt werden, um genauere Aussagen hierzu treffen zu können.

Die Rate an virusinfizierten Konidien durch eine reduzierte Viruskonzentration im Ausgangsmyzel des *F. graminearum* Wildtyps konnte erhöht werden, jedoch von etwa 20% bei hoher Viruskonzentration auf nur auf maximal 35% (**Abbildung 26**). Es ist also wahrscheinlich, dass noch weitere Faktoren als eine reduzierte pilzliche Abwehrreaktion eine Rolle in der Ausbreitung der Viruspartikel spielen. Analog zur Ausbreitung von Viren in Pflanzen über Plasmodesmata könnten die Poren und ihre Mechanismen zum Verschluss auch einen Einfluss auf die Ausbreitung innerhalb des Myzels und in die Konidien haben.

Folglich wurden die Proteine Hex-1 und SO, die beide in der Lage sind, septale Poren unter bestimmten Bedingungen zu verschließen analysiert. Der Verschluss septaler Poren ist unter anderem ein elementarer Bestandteil in der Bildung von Konidien, um diese von den Phialiden zu trennen (Demarini *et al.*, 1977).

Ein deutlicher Hinweis auf eine Beteiligung der Proteine bei der Regulation der Ausbreitung von Viruspartikeln wäre eine virusabhängige Regulation der Genexpression. Die Expressionsstärken der beiden Proteine waren während einer Virusinfektion im Vergleich zu virusfreiem Myzel jedoch nicht signifikant erhöht (**Abbildung 22**).

Üblicherweise werden während einer Virusinfektion Gene reguliert, die an Verteidigungsmechanismen und der Immunantwort des Wirtes beteiligt sind oder die für das Virus für die Replikation benötigt werden. In *F. graminearum* kommt es durch eine Infektion mit FgV1 zu einer allgemeinen Hochregulation von Genen, die für die Transkriptions- und Translationsmaschinerie in Pilzzellen erforderlich sind, was für die Replikation des Virus förderlich ist. Zusätzlich wird eine Vielzahl von Genen herunterreguliert, die vor allem für Stoffwechsel- und Transportsysteme der Wirtszelle erforderlich sind (Cho *et al.*, 2012). Eines der Gene, die während einer Infektion mit FgV-ch9 herunterreguliert werden, ist das vr1 Gen, was für das mRNA bindende Protein Vr1 kodiert. Wird die Expression von Vr1 künstlich reduziert, kommt es im Pilz zu virusähnlichen Effekten, wie ein reduziertes Wachstum, reduzierter Konidienbildung und Hypovirulenz-ähnliche Eigenschaften (Bormann *et al.*, 2018). Auch andere Proteine wie

DISKUSSION

das M1 Protein des vesikulären Stomatitis-Virus inhibieren die vom Wirt gesteuerte Genexpression, indem sie in Transkriptions- und Translationsprozesse eingreifen und so unter anderem die für die Transkription nötige RdRP und verschiedene Schritte beim Transport von mRNA aus dem Zellkern inhibieren (Park *et al.*, 2020; Rajani *et al.*, 2012). Proteine mit ähnlicher Funktion können die antivirale Reaktion des Wirtes verhindern und einen generellen *virus-induced host gene shutoff* (VGS) auslösen. Der VGS ist ein Phänomen, welches während Virusinfektionen sowohl in Pilzen, Pflanzen als auch Tieren vorkommen kann und verschiedene Stufen der Genexpression von Wirtsgenen beeinflusst (Walsh & Mohr, 2011). Auch das humanpathogene Vaccinia Virus kann aktiv die Expression verschiedener Wirtsgene herabregulieren. Es degradiert beispielsweise die mRNAs von Aktin und Tubulin und reduziert die Expression dieser damit signifikant (Guerra *et al.*, 2003; Rice & Roberts, 1983).

Es ist also möglich, dass die Transkription des Haushaltsgens β -Tubulin während einer Virusinfektion herabreguliert war und so die leichte Erhöhung der Transkriptionslevel von Hex-1 und SO, die auf das Transkriptionsniveau des Haushaltsgens normalisiert wurden, entstanden. Diese Theorie wird durch Transkriptionsdaten eines virusinfizierten FgPH1 unterstützt. Das Transkriptionsprofil zeigte bei ungefähr 8.4% der Gene einen signifikanten Anstieg in der Expressionsmenge und bei 6.2% eine signifikante Reduktion. 85.4% der Gene waren nicht signifikant betroffen. Ein genereller VGS findet in FgV-ch9 infiziertem *F. graminearum* Wildtyp damit nicht statt (Bormann *et al.*, 2018; Vreede & Fodor, 2010). Auch die Transkriptionslevel von Hex-1 und SO waren anhand dieser Transkriptionsdaten nicht signifikant hoch- oder herunterreguliert (C. Heinze, Universität Hamburg, pers. Mitteilung). Daten von Transkriptionsanalysen zeigten allerdings nur den Zustand eines einzelnen Zeitpunktes, im Fall von FgPH1, von drei Tage alten Kulturen. Es kann hier nicht ausgeschlossen werden, dass eine Regulation zu anderen Zeitpunkten durchaus gegeben ist.

Interessanterweise konnte eine Regulation des Vr1 von Bormann *et al.* (2018) zwar über qPCR gezeigt werden, diese konnten aber in den Transkriptionsdaten nicht bestätigt werden. Deswegen ist weiterhin unklar, ob und wann eine Regulation von Hex-1 und SO gegeben ist (C. Heinze, Universität Hamburg, pers. Mitteilung).

5.2 Die Deletion des Hex-1 Proteins führt zu einer verzögerten Ausbreitung des Myzels in Weizen

Hex-1 ist der Hauptbestandteil von *Woronin bodies* und diese verschließen septale Poren hauptsächlich bei physikalischem Stress wie Hyphenverletzungen. Möglicherweise kommt es aufgrund einer Virusinfektion auch zu einer durch die Infektion induzierten Stressantwort, die dazu führt, dass *Woronin bodies* die septalen Poren verschließen und es so zu einer dysregulierten und inhibierten Ausbreitung und Verteilung kommt.

Für *F. graminearum* wurde von Son *et al.* (2013) gezeigt, dass sowohl eine Deletion als auch die Überexpression von Hex-1 zu einer verringerten Konidienproduktion im Vergleich zum Wildtyp führt. Auch war die allgemeine Konidienproduktion in den virusinfizierten Stämmen signifikant vermindert.

Die Konidienproduktion der Hex-1 Mutanten war im Vergleich zum Wildtyp sowohl in der Deletions- als auch der Überexpressionsmutante um ca. 30% reduziert (**Abbildung 31**). Die Ergebnisse der Konidienproduktion unterlagen einer hohen Varianz, sodass eine eindeutige signifikante Reduktion auf Grundlage dieser Ergebnisse nicht bestätigt werden konnte. Die hohe Varianz während der Konidienproduktion könnte daran liegen, dass die Produktion von Konidien in *F. graminearum* Kulturen von verschiedenen Faktoren abhängig ist. So ist eine gute Luftzufuhr, um eine optimale Zellatmung zu gewährleisten, sehr wichtig. Dem entsprechend ist das Volumen des Kulturmediums und damit das Verhältnis zwischen Medium und Kulturgefäß entscheidend und zeigte einen Einfluss auf die Konidienproduktion (Merdekawati, 2023; Singh *et al.*, 1992). Eine Erhöhung der Stichprobengröße könnte zu einer Verminderung der Varianz und somit eindeutigeren Ergebnissen führen.

Eine Anwendung der Hypovirulenz in Feld kann nur erfolgen, wenn die Virulenz der Stämme die des Wildtyps nicht übersteigt. Daher wurden die Mutanten auf ihre Virulenz hin untersucht.

Ein Einfluss auf die allgemeine Pathogenität auf Weizen konnte in den Hex-1 Mutanten nicht ausgemacht werden. Hier zeigten die Hex-1 Mutanten mit durchschnittlich 70-75% infizierter Ährchen zum Wildtyp (80%) vergleichbare Ergebnisse, wobei die Hex-1 Deletionsmutante ähnlich wie in der Konidienproduktion ebenfalls eine hohe Varianz zwischen den einzelnen Ähren aufwies (**Abbildung 36**). Die Ausbreitungsgeschwindigkeit und die Anzahl an Infektionsstrukturen in der Überexpressionsmutante war mit dem Wildtyp vergleichbar. Die Deletionsmutante zeigte

DISKUSSION

im Vergleich zum Wildtyp eine leichte Reduktion in der Ausbreitungsgeschwindigkeit und in der Anzahl der Infektionsstrukturen (**Abbildung 39, Abbildung 42**). Ein Einfluss durch eine verminderte Konidienkeimungsrate oder einen Defekt in der Perithezienbildung konnte ausgeschlossen werden (**Abbildung 31, Abbildung 32**).

Andere Studien in *F. graminearum* und *M. grisea* zeigten, dass es in Hex-1 Deletionsmutanten zu einer reduzierten Pathogenität auf Weizen kommt. In *F. graminearum* beispielsweise konnten im Durchschnitt nur noch 50% der Weizenähren infiziert werden (Son *et al.*, 2013). In *M. grisea* konnten in den Hex-1 Deletionsmutanten morphologische Defekte in der Ausbildung von Infektionsstrukturen und eine verspätete Penetration von Wirtszellen beobachtet werden (Soundararajan *et al.*, 2004). Dies deckt sich mit eigenen Beobachtungen. Auch hier zeigten Mutanten mit deletiertem Hex-1 weniger Infektionsstrukturen und eine verlangsamte Ausbreitung in der Ähre im Vergleich zum Wildtyp.

Soundararajan *et al.* (2004) stellten die Hypothese auf, dass die reduzierte Virulenz der Hex-1 Mutanten in *M. grisea* darauf zurückzuführen ist, dass *Woronin bodies* eine Rolle bei der Penetration von Wirtszellen spielen und eine Deletion dazu führt, dass die Hyphen dadurch verlangsamt in Wirtszellen eindringen können und somit möglicherweise mehr Zeit für die pflanzliche Abwehr bleibt.

Der genaue Mechanismus, der zu einer verlangsamten Penetration der Wirtszellen führt, ist nicht bekannt, doch konnte in *Alternaria brassicicola* und *Aspergillus fumigatus* ein Transmembranprotein (Tmpl) identifiziert werden, das mit *Woronin bodies* assoziiert ist. Es wird angenommen, dass sich das Tmpl in der Membran von spezialisierten *Woronin bodies* befindet, die nicht an septalen Poren lokalisiert sind (Kim *et al.*, 2009) und essentiell für die Regulation der intrazellulären Level an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ist. Fehlt Tmpl kommt es zu einem durch oxidativen Stress ausgelösten Unvermögen Pflanzenzellen über Appressorien zu penetrieren. Bei einer gestörten ROS Homöostase durch die Deletion von Tmpl kommt es zudem auch zu einer verminderten Konidienproduktion (Kim *et al.*, 2009). Dies deutet darauf hin, dass eine übermäßige Akkumulation von ROS in den Konidien die Bildung dieser inhibiert oder ihre Lebensfähigkeit mutmaßlich herabsetzt.

Bei einer Deletion von Hex-1 kann es durch die Abwesenheit von *Woronin bodies* zu einer eingeschränkten Funktion von Tmpl kommen, was die verzögerte Ausbreitungsgeschwindigkeit und die verringerte Konidienproduktion der Hex-1 Deletionsmutanten erklären könnte.

5.3 Hex-1 ist kein Wirtsfaktor für FgV-ch9

Für FgV1 zeigte sich, dass Hex-1 als Wirtsfaktor fungieren kann. Es ist an der Replikation von FgV1 beteiligt und bindet unspezifisch an die untranslatierten Regionen (UTRs) der viralen RNA, was zur Akkumulation der viralen RNA beiträgt (Son *et al.*, 2013; Son *et al.*, 2016). *Fusarium graminearum* virus 1 ist ein einzelsträngiges RNA Virus ((+)ssRNA) aus der Familie der *Fusariviridae* (Honda *et al.*, 2020) und unterscheidet sich damit von dem dsRNA Mykovirus FgV-ch9.

Son *et al.* (2013) spekulierten, dass FgV1 über die Interaktion mit Hex-1, welches eine peroxisomale Erkennungssequenz besitzt, seine Replikation in Peroxisomen fördert. Dies scheint für FgV-ch9 eher unwahrscheinlich. FgV-ch9 besitzt ein dsRNA Genom, wohingegen FgV1 ein (+)ssRNA Genom besitzt. Auch bildet FgV-ch9 isometrische Viruspartikel in denen die fünf unterschiedlichen dsRNAs womöglich einzeln verpackt sind, wohingegen FgV-1 wahrscheinlich keine Viruspartikel bildet und aus einem einzelnen Segment mit vier ORFs besteht (Ayllón & Vainio, 2023; Darissa *et al.*, 2011; Kwon *et al.*, 2007). Diese beiden Viren sind vom Aufbau sehr unterschiedlich und besitzen daher unterschiedliche Replikationsstrategien und -mechanismen.

Hex-1 erleichtert die Akkumulation von FgV1-RNA möglicherweise dadurch, dass es Struktur- und Sequenzhomologie mit dem Translationsinitiationsfaktor eIF5A aufweist. Das hoch konservierte eIF5A bindet möglicherweise an die Nukleinsäure des FgV1 und fördert dadurch die virale Replikation (Son *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2003). Die Virulenz der *F. graminearum* Mutanten mit deletiertem oder überexprimiertem Hex-1 ist leicht reduziert (**Abbildung 36**). Einer Anwendung im Feld würde dahingehend also nichts entgegenstehen.

Sowohl bei der Deletion, als auch bei der Überexpression von Hex-1 war das Verteilungsmuster von FgV-ch9 in infiziertem Myzel mit dem Verteilungsmuster in infizierten Wildtyp-Kulturen vergleichbar (**Abbildung 25**). Auch die Ausbreitung von Viruspartikeln in Konidien der beiden Mutanten zeigte eine ähnliche Übertragungseffizienz wie im Wildtyp (**Abbildung 27**).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass *Woronin bodies* keinen positiven und auch keinen negativen Einfluss auf die Verteilung und Ausbreitung der Viruspartikel haben und sich die septalen Poren als Stressantwort auf eine Virusinfektion nicht verschließen.

Die subzelluläre Lokalisation des eGFP markierten Hex-1 Proteins erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie. Zur besseren Detektierbarkeit wurde hier das

DISKUSSION

pks12-Gen ausgeschaltet, um die Produktion von Aurofusarin und Rubrofusarin zu inhibieren (Frandsen *et al.*, 2006; Malz *et al.*, 2005). Malz *et al.* (2005) zeigten bereits in vorangegangenen Studien, dass sich die pks12 Deletionsmutanten wie der *F. graminearum* Wildtyp verhalten.

Es konnten keine Unterschiede in der Lokalisation des Hex-1 Proteins in virusfreiem und virusinfiziertem Myzel detektiert werden. Eine Quantifikation über Fluoreszenzmikroskopie ist nur eingeschränkt möglich, sodass mittels der Mikroskopie nicht ausgeschlossen werden kann, dass in infizierten Zellen eine andere Konzentration von eGFP-Hex-1 vorlag als in nicht infizierten Zellen.

Die subzelluläre Lokalisation mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie zeigte außerdem, dass die aus dem Hex-1 Protein bestehenden *Woronin bodies* sich in der Regel nahe der septalen Poren befinden. Weitere vereinzelte Signale konnten innerhalb der Zellen detektiert werden (**Abbildung 28**). Diese vereinzelten Signale sind zum einen durch die Biogenese der *Woronin bodies* zu erklären. Hex-1 Proteine besitzen eine peroxisomale Erkennungssequenz (PTS1) und werden nach Translation in die Peroxisomen transportiert, wo sie zu *Woronin bodies* assemblieren. Nachdem die *Woronin bodies* die Peroxisomen verlassen haben, werden sie über das Zytoskelett der Zelle zu den septalen Poren transportiert und dort verankert (Ng *et al.*, 2009). Die vereinzelten eGFP-Hex-1 Signale in den Zellen sind wahrscheinlich Hex-1 Proteine auf dem Weg in Peroxisomen oder, aufgrund des hohen Fluoreszenzsignals wahrscheinlicher *Woronin bodies* auf dem Weg zu den septalen Poren. Auch konnten in anderen Pilzen *Woronin bodies* in nicht-septalen Regionen, wie den Hyphenspitzen und der Zellperipherie lokalisiert werden (Momany *et al.*, 2002). Ein Beispiel hierfür sind die mit TmpL assoziierten *Woronin bodies*, die sich vermehrt in den Hyphenspitzen befinden (Kim *et al.*, 2009).

Zudem exprimiert die Überexpressionsmutante viermal so viel Hex-1, wie der Wildtyp, was ebenfalls eine Aggregation von Hex-1 Proteinen in der Zelle erklären kann, die dann nicht der Situation im Wildtyp entsprechen (**Abbildung 15**).

5.4 Zusammenfassung Hex-1

Hex-1 Deletionsmutanten zeigten eine leichte Reduktion in der Konidienproduktion und eine reduzierte Ausbreitungsgeschwindigkeit in Weizen. Ansonsten verhielten sich die Hex-1 Mutanten wie der Wildtyp. Es gab keine phänotypischen Veränderungen der

DISKUSSION

Mutanten und die Konidienkeimung sowie die Perithezienbildung unterschieden sich nicht vom Wildtyp.

Eine Reduktion in der Konidienproduktion und der Ausbreitungsgeschwindigkeit in Weizen wurden beobachtet und könnten mit einer speziellen Funktion von *Woronin bodies* zusammenhängen. Diese können mit TmpL assoziiert sein, welches eine wichtige Rolle in der Regulation der ROS Homöostase in Hyphen spielt. Ein Defekt in der TmpL Funktion kann so zu vermehrten oxidativen Stress führen und resultiert in einer verminderten Bildung von Appressorien und einer reduzierten Konidienproduktion.

In virusinfizierten Mutanten konnte weder in der Deletions- noch in der Überexpressionsmutante eine Steigerung der Ausbreitungseffizienz von FgV-ch9 in die Konidien festgestellt werden. Auch das Verteilungsmuster des Virus in Myzel entsprach dem Verteilungsmuster im virusinfiziertem Wildtyp.

Hex-1 ist demnach während einer FgV-ch9 Infektion weder an der Akkumulation viraler RNA beteiligt, noch sind *Woronin bodies* an dem virusinduzierten Verschluss septaler Poren beteiligt. Hex-1 ist kein Wirtsfaktor, der sich positiv auf die Ausbreitung und Verteilung von FgV-ch9 Viruspartikeln im Myzel oder in Konidien auswirkt und damit kein Kandidat für eine Mutation zur Erhöhung der Infektionsrate der Konidien zur Anwendung in der Praxis.

5.5 Das SO Protein ist in *F. graminearum* essentiell für die Bildung von Anastomosen, Perithezien und Appressorien

Während für das Hex-1 die Hauptfunktion des Porenverschließens durch mechanischen Stress bekannt ist, zeigt SO bei unterschiedlichen Stressbedingungen eine Aggregation an septalen Poren verschiedener Ascomyzeten (Fleissner & Glass, 2007; Maruyama *et al.*, 2010). Möglicherweise kommt es aufgrund einer Virusinfektion nicht zu einem durch *Woronin bodies* aber durch SO induzierten Verschluss septaler Poren und damit zu einer regulierten und inhibierten Ausbreitung und Verteilung von Viruspartikeln in Myzel und Konidien. Es lagen weder Daten zu SO in *F. graminearum* noch zu SO unter Virusstress bei anderen Pilzen vor. Daher wurden zunächst die phänotypischen und morphologischen Eigenschaften der Deletions- und Überexpressionsmutanten charakterisiert.

Nach sechs Tagen bildeten die SO Deletionsmutanten ein an Watte erinnerndes Luftmyzel, welches nach ca. 21 Tagen in sich zusammen fiel (**Abbildung 35**). Ein ähnlicher Phänotyp konnte ebenfalls in *N. crassa* beobachtet werden und aufgrund der optischen

DISKUSSION

Eigenschaften der SO Deletionsmutante wurde der Name *soft* für dieses Protein gewählt (Fleissner *et al.*, 2005).

Vom SO in *N. crassa* ist bekannt, dass SO essentiell für die Vermittlung der Hyphenfusionen und die Bildung von Anastomosen ist (Fleissner *et al.*, 2005). Der Phänotyp in *F. graminearum* resultierte daher vermutlich aus der Bildung von deutlich weniger intrazellulären Verzweigungen als im Myzel der jeweiligen Wildtypen, was in einer Instabilität des Myzels mündete.

Das SO ist weder an einer verminderten Konidienkeimungsrate noch bei der Konidienproduktion beteiligt (**Abbildung 31**). Studien von SO in *N. crassa* deuten ebenfalls darauf hin, dass SO weder einen Einfluss auf die Konidiproduktion noch -keimung hat (Fleissner *et al.*, 2005).

Die Perithezien wurden nur in den Mutanten, in denen SO normal oder überexprimiert wurde, gebildet. Alle Mutanten in denen SO reduziert oder deletiert war, konnten keine Perithezien und somit auch keine Ascosporen bilden (**Abbildung 32**). Ein mit diesen Daten vergleichbarer Defekt in der Produktion von sexuellen Sporen konnte bereits in *so*-Deletionsmutanten in *N. crassa* und *S. macrospora* beobachtet werden. Perithezien sind eine vom Myzel ausgehende komplexe Struktur, die sowohl die Fähigkeit der Hyphenfusion als auch der Kompartimentierung voraussetzt. Fehlt SO können Hyphen nicht miteinander fusionieren. Möglicherweise spielt SO zudem auch eine Rolle bei der Kompartimentierung und Abgrenzung vegetativer und sexueller Hyphen durch seine Fähigkeit septale Poren zu verschließen (Engh *et al.*, 2007; Teichert *et al.*, 2014). Eine *so*-Deletionsmutante wäre aus Sicht der biologischen Sicherheit demnach hervorragend für einen Einsatz in der Praxis geeignet. Sie bildet Konidien, jedoch keine Ascosporen, die als Überdauerungsorgane zwischen den Anbauphasen fungieren.

Die Pathogenität der SO Überexpressionsmutanten war mit der des Wildtyps vergleichbar (**Abbildung 36**). Auch die Ausbreitungsgeschwindigkeit und die Anzahl von Infektionsstrukturen unterschied sich nicht vom Wildtyp (**Abbildung 41**). Die Pathogenität der SO Deletionsmutanten hingegen war im Vergleich zum Wildtyp stark reduziert und eine phänotypisch sichtbare Infektion begrenzte sich in den meisten Infektionen auf die inokulierten Ährchen. Auch die Ausbreitungsgeschwindigkeit war stark reduziert. Die Mutanten waren zwar fähig das inokulierte Ährchen über den Rachisknoten zu verlassen, doch konnten sie in der Regel kein weiteres Ährchen aus der Rachis heraus infizieren (**Abbildung 40, Abbildung 41**).

DISKUSSION

Auch in dem nekotropen *A. brassicicola* führte die Deletion des SO Homologs Aso1 zu einer stark eingeschränkten Infektiosität des Erregers und konnte sich nicht über die Inokulationsstelle hinaus ausbreiten, was auf die Unfähigkeit Anastomosen zu bilden zurückzuführen war. Wenn es einem Pilz nicht gelingt, Anastomosen und damit ein intrazellulär verzweigtes Hyphennetzwerk zu bilden, scheint er nicht in der Lage zu sein, organisierte Strukturen wie Perithezien oder Infektionsstrukturen zu bilden (Craven *et al.*, 2008; Engh *et al.*, 2007). Dies konnte in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt werden (**Abbildung 42, Abbildung 32**). In *Fusarium verticillioides* ist SO ebenfalls für die Pathogenität auf Mais essentiell, was auf das Unvermögen zur Bildung von Anastomosen und einer reduzierten Stressresistenz zurückzuführen ist, die sie anfälliger gegenüber des Immunsystems des Wirtes werden lassen. Es ist möglich, dass das stressinduzierte Verschließen septaler Poren durch SO ein wichtiger Bestandteil der pilzlichen Abwehr ist und das Fehlen von SO Proteinen zu einer geringeren Toleranz gegenüber pflanzlicher Abwehrmechanismen führt (Guo *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2013).

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die Überwindung des Rachisknotens für eine systemische Ausbreitung des Pilzes von entscheidender Bedeutung (Proctor *et al.*, 1995). Das Trichothecen DON, welches die Bildung der Zellwandverdickungen hemmt ist als Virulenzfaktor unerlässlich für eine erfolgreiche systemische Infektion und wird in komplexeren Infektionsstrukturen gebildet (Boenisch & Schäfer, 2011; Jansen *et al.*, 2005; Maier *et al.*, 2006). Dies sind Strukturen, die es dem Pilz ermöglichen, natürliche Barrieren der Pflanzenzelle – die Zellwand – zu überwinden. Sie bestehen aus modifizierten Hyphen, den Appressorien, die auf das Eindringen in pflanzliches Gewebe spezialisiert sind. (Braun & Howard, 1994; Mendgen *et al.*, 1996). Die Bildung von Appressorien setzt ein intrazellulär verzweigtes Hyphennetzwerk voraus. Es konnte gezeigt werden, dass Mutanten mit einem Defekt in der SO Expression nicht in der Lage sind, solch ein stark verzweigtes Hyphennetzwerk auszubilden, was dazu führt, dass diese Mutanten einen Defekt in der Ausbildung von Infektionsstrukturen haben.

Zudem spielt auch der CWI-Signalweg eine essentielle Rolle in der Bildung von Appressorien. Der CWI-Signalweg besteht aus einer MAP-Kinase Kaskade, die in *N. crassa* und *S. macrospora* und möglicherweise auch in *F. graminearum* mit SO als Gerüstprotein den Kernbestandteil des Signalweges darstellen. Bei Deletion einer oder mehrerer der MAP-Kinasen des CWI-Signalwegs kam es in *M. oryzae*, *C. gloeosporioides* und *C. scovillei* zu einem Defekt in der Ausbildung von Appressorien und im Zusammenhang dazu zu

einem Unvermögen die pflanzliche Zellwand erfolgreich zu penetrieren (Fang *et al.*, 2018; Fu *et al.*, 2023; Jeon *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 1998).

5.6 SO hat als Wirtsfaktor einen positiven Einfluss auf die Ausbreitungseffizienz von FgV-ch9

Es sind keine Studien zum Einfluss von SO auf eine Virusinfektion und Replikation publiziert. Deswegen wurde FgV-ch9 über Hyphenfusionen (Ko-Kultivierung) von virusinfiziertem Myzel auf virusfreies Myzel der SO Deletions- und Überexpressionsmutanten übertragen (**Abbildung 21**). Die Virusinfektion der SO Deletionsmutanten war nicht erfolgreich, was mit dem Unvermögen der Bildung von Anastomosen dieser Mutanten erklärt werden kann. Das SO ist in *N. crassa* an der Vermittlung der Hyphenfusionen beteiligt, indem es in der Sekretion von Signalmolekülen während der chemotrophen Interaktion von Hyphenspitzen, eine wichtige Rolle spielt. Das SO ist zusammen mit der MAP-Kinase MAK-2 direkt an dem „Ping-Pong-Mechanismus“ von Signalsendung über SO und Signalempfang durch den MAK-2 Komplex beteiligt. Die Rekrutierung von SO und dem MAK-2 Komplex findet hochgradig koordiniert, in exakter Antiphase zwischen den beiden Hyphenspitzen statt (Daskalov *et al.*, 2017; Fleissner *et al.*, 2009; Goryachev *et al.*, 2012). Fehlt SO, kann die Hyphe weder eine andere Hyphenspitze anziehen, noch auf sie reagieren (Fleissner *et al.*, 2005; Herzog *et al.*, 2015). Anastomosenbildung und eine Virusübertragung über Hyphenfusionen ist so nicht möglich.

Daher wurde in früheren Studien versucht, über das Mischen von virusinfizierten FgPH1 und virusfreien Δso Konidien eine Virusinfektion in den *so*-Deletionsmutanten zu erreichen. Konidien der meisten Ascomyzeten bilden so genannte *conidial anastomosis tubes* (CATs). Diese sind dünne Hyphen, die bei keimenden Konidien gebildet werden. Zwischen Konidien spielen sie eine wichtige Rolle beim Austausch von Zellinhalten, einschließlich Zellkernen, Organellen und Zytoplasma. Sie vermitteln ebenfalls die Zellkommunikation und -fusion zwischen vegetativ kompatiblen Konidien (Roca *et al.*, 2005). Die Deletion des *so* Gens führte in *N. crassa* zu einer signifikant geringeren Ausbildung der CATs. Die Fusionen zwischen CATs in *N. crassa* unterliegen dem gleichen Mechanismus wie Hyphenfusionen vegetativer Hyphen über den SO/MAK-2 Zelldialog, sodass eine Fusion zwischen ausgekeimten Konidien mit *so*-Deletionskeimlingen nicht möglich ist (Fleissner *et al.*, 2009).

DISKUSSION

Um eine FgV-ch9-Infektion in SO defizienten Mutanten zu erreichen, wurde in dieser Arbeit eine Mutante mit regulierbarem *Tcu* Promoter generiert, die bei aktivem Promoter SO exprimiert. Die Ko-Kultivierung von Donor und Akzeptor war unter aktivem, also SO exprimierenden Bedingungen, erfolgreich. Unter SO reprimierenden Bedingungen, bei der SO nur zu 40% exprimiert wurde, blieb die Virusinfektion stabil (**Abbildung 23**).

Viren sind für ihre Replikation und die Translation der viralen Proteine auf wirtseigene Prozesse angewiesen. Im Laufe ihres Replikationszyklus interagieren sie mit verschiedenen Wirtsfaktoren, um beispielsweise die Bildung von Replikationskomplexen zu initiieren oder die Akkumulation und intrazelluläre Bewegung der viralen RNA erleichtern (Boguszewska-Chachulska & Haenni, 2005; Son *et al.*, 2013; Son *et al.*, 2016). Die Virusinfektion war bei reprimierter SO Expression stabil und mit der Infektion im Wildtyp vergleichbar. Bei völligem Verlust der SO Expression könnte jedoch eine andere Situation vorliegen und die Virusreplikation sich doch vom Wildtyp unterscheiden.

Sowohl bei der Repression ($Fgso\downarrow^{0.4}$) als auch der Überexpression ($Fgso\uparrow^{2.3}$) von SO war das Verteilungsmuster von FgV-ch9 in infiziertem Myzel mit dem Verteilungsmuster in infizierten Wildtyp-Kulturen vergleichbar (**Abbildung 25**). Die Ausbreitung von Viruspartikeln in Konidien der beiden Mutanten zeigte jedoch starke Unterschiede in der Übertragungseffizienz (**Abbildung 27**).

Die Ausbreitung des FgV-ch9 in die Konidien zeigte bei SO Repression eine signifikant verringerte Effizienz, wenn die Konidien aus Myzel mit einer hohen Viruskonzentration produziert wurden. Die SO Überexpression hatte dagegen in Kombination mit Konidien, produziert aus Myzel mit einer niedrigen Viruskonzentration, einen positiven Effekt. Dies bedeutet auch, dass die septalen Poren als Stressantwort auf eine Virusinfektion nicht durch eine Akkumulation von SO an den septalen Poren verschlossen wird.

Wie weiter oben bereits erwähnt, spielen Homologe von SO in *N. crassa* und *S. macrospora* zusammen mit MAK 2 über einen „Ping-Pong-Mechanismus“ von Signalsendung über SO und Signalempfang durch den MAK-2 Komplex eine wichtige Rolle in der Vermittlung von Hyphenfusionen. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf einen ähnlichen Mechanismus bei *F. graminearum* hin.

Gestützt wird diese Vermutung durch die subzelluläre Lokalisation des SO, das sich sowohl in virusfreiem als auch in virusinfiziertem Myzel verteilt im Zytoplasma und an den Hyphenspitzen befindet, wo die Rekrutierung von SO stattfindet (Daskalov *et al.*, 2017; Fleissner *et al.*, 2009; Goryachev *et al.*, 2012).

DISKUSSION

Zur besseren Detektierbarkeit wurde hier das pks12-Gen ausgeschaltet, um die Produktion von Aurofusarin und Rubrofusarin zu inhibieren (Frandsen *et al.*, 2006; Malz *et al.*, 2005). Eine mögliche Interferenz zwischen den beiden Pigmenten (400-550 nm) und dem mCherry Reporter gen (540-590 nm) konnte so vermieden werden (Dufossé *et al.*, 2018; Shu *et al.*, 2006). Die Detektion von SO in *F. graminearum* unter nativem Promoter gelang nicht, da möglicherweise das SO-mCherry Fusionsprotein unter dem Detektionslimit lag.

Homologe von SO in *N. crassa* und *S. macrospora* dienen zusätzlich als Gerüstprotein, das direkt mit den MAP-Kinasen MIK-1 und MEK-1 und indirekt mit MAK-1 interagiert (Teichert *et al.*, 2014; Weichert *et al.*, 2016). Dieser Komplex bildet den Kernbestandteil des CWI-Signalweges, der Signale von der Zellwand über eine MAP-Kinase Kaskade weiterleitet und sich grundsätzlich in Hyphenspitzen befindet (Weichert *et al.*, 2016).

Viren sind für ihren Lebenszyklus letztlich von der Wirtszelle abhängig. Zelluläre Signalwege werden von Viren für ihre eigene effektive Replikation, Translation und Transport genutzt (Kumar *et al.*, 2018a). Auch MAP-Kinase-Kaskaden, die in virusinfizierten Zellen unter anderem an der Regulierung der Immunantwort und der Apoptose beteiligt sein können, werden von Viren beeinflusst. Die MAPK-Signalübertragung kann entweder als positiver oder negativer Regulator der viralen Replikation wirken. Viren können beispielsweise in die Rho GTPase-Signalwege eingreifen, um den Zusammenbau der Viruspartikel oder die Ausbreitung im Wirt zu erleichtern (van den Broeke *et al.*, 2014). Dies ist interessant, da auch das SO Homolog in *S. macrospora* indirekt mit der Rho GTPase RHO1 interagiert (Fischer & Glass, 2019). Ein Beispiel für eine virusinduzierte Regulation ist die durch das Influenzavirus gesteigerte Aktivierung der Rho GTPase Cdc42, welche den Transport von viralen Hüllproteinen und damit die Virusproduktion fördert (Wang *et al.*, 2012). Durch eine Virusinfektion kann es aber auch zu starkem ER-Stress (endoplasmatischem Restikulum-Stress) kommen, wodurch MAP-Kinasen aktiviert werden, die zu einer verstärkten Immunantwort beitragen (Su *et al.*, 2002).

Auch über Signalwege der Proteinkinase C, die ebenfalls mit SO Homologen interagiert, können Viren ihre Replikation fördern (Fischer & Glass, 2019). Beispiele hierfür sind das Hepatitis-C-Virus und das Humane Immundefizienz-Virus (Contreras *et al.*, 2012; Fimia *et al.*, 2004; Heinisch & Rodicio, 2018). Zudem werden über die MAK-1 und MAK-2 Signalwege die Transkription von Genen reguliert, indem Transkriptionsfaktoren

DISKUSSION

aktiviert oder reprimiert werden. Während der Virus-Wirt-Interaktion werden Transkriptionsfaktoren nicht nur zur Unterstützung der viralen Replikation genutzt, sie regulieren auch direkt oder indirekt die Abwehrreaktion des Wirts durch Aktivierung oder Unterdrückung von nachgeschalteten Signalwegen (Alves *et al.*, 2014).

Es konnte bereits für *F. graminearum* gezeigt werden, dass Transkriptionsfaktoren während einer Virusinfektion unterschiedlich exprimiert werden und so Einfluss auf die Infektion nehmen können (Lee *et al.*, 2014; Yu & Kim, 2021). So kann FgV1 die antivirale Reaktion des Wirts durch Unterdrückung der Transkription von Genen, die mit der RNAi zusammenhängen, inhibieren (Yu *et al.*, 2020). Ein Beispiel dafür ist der Transkriptionsfaktor Swi6, der bei einer FgV1 Infektion vermindert exprimiert wird, was unter anderem eine starke Reduktion der Konidienproduktion zur Folge hat (Liu *et al.*, 2013; Son *et al.*, 2016). Die Konidienproduktion in allen virusinfizierten Mutanten und im Wildtyp war ebenfalls stark reduziert, was darauf hindeutet, dass auch hier Swi6 oder ein anderer Transkriptionsfaktor virusabhängig herunterreguliert wurde. Möglicherweise können Transkriptionsfaktoren, die über den MAK-1 Signalweg mit Beteiligung des SO Proteins reguliert werden, von FgV-ch9 so manipuliert werden, dass es zu einer effektiveren Ausbreitung von Viruspartikeln im Myzel und den Konidien kommt. Eine Überexpression des SO Proteins hätte hierbei möglicherweise einen positiven Effekt auf die Aktivität des Signalweges. Dagegen spricht, dass die direkte Hochregulation von SO durch eine Virusinfektion nicht bestätigt werden konnte (**Abbildung 22**).

Eine weitere Erklärung für die verbesserte Ausbreitung von Viruspartikeln in SO Überexpressionsmutanten könnte ein verbesserter direkter oder indirekter Transport von SO an die Hyphenspitzen sein. Eine Hypothese ist, dass der kritische Punkt der Übertragung von Viruspartikeln in die Konidien die Akkumulation in Konidiophoren ist, da Viruspartikel oftmals nicht schnell genug in die Hyphenspitzen gelangen, wenn diese wachsen (Demarini *et al.*, 1977; Eusebio-Cope *et al.*, 2010). Durch einen direkten oder indirekten Transport von Viruspartikeln über SO, dass regelmäßig an die Hyphenspitzen oszilliert, könnte die Wahrscheinlichkeit gesteigert werden, dass Viruspartikel in die Konidiophoren und anschließend in die Konidien gelangen. SO besitzt eine WW-Domäne, die üblicherweise für Protein-Protein oder Protein-Liganden Wechselwirkungen wichtig ist. Sie kann Prolin-reiche Domänen bzw. Proteine, und an Domänen, die Phosphoserin-Phosphothreonin beinhalten, binden (Chen & Sudol, 1995). Ob SO eine

DISKUSSION

direkte oder indirekte Interaktion mit einem oder beiden FgV-ch9 Capsid-Untereinheiten eingeht, ist jedoch unbekannt.

5.7 Zusammenfassung SO

SO Deletionsmutanten können keine Anastomosen bilden und zeigten eine starke Reduktion in der Pathogenität auf Weizen und einen Defekt in der Perithezienbildung. Die Mutanten haben einen Defekt in der Ausbildung von Infektionsstrukturen, möglicherweise durch eine Störung des für die Appressorienbildung wichtigen CWI-Signalwegs und durch einen Defekt in der Hyphenfusion. Durch die verminderte Fähigkeit Infektionsstrukturen zu bilden, kann es ebenfalls zu einer reduzierten DON-Produktion kommen, was dazu führt, dass die Zellwandverdickungen im Rachisknoten nicht inhibiert werden können. Mutanten, die nicht in der Lage sind, Infektionsstrukturen zu bilden, haben daher Schwierigkeiten pflanzliches Gewebe zu penetrieren und gelangen nur selten über die Zellwandverdickungen des Rachisknotens hinaus, wodurch eine systemische Infektion der Ähre erschwert wird.

In virusinfizierten Mutanten zeigte sich eine signifikante Reduktion der Ausbreitungseffizienz in SO reprimierten Mutanten und eine signifikante Erhöhung der Ausbreitungseffizienz in SO überexprimierten Mutanten. SO hat demnach als Wirtsfaktor für FgV-ch9 einen positiven Einfluss auf die effektive Ausbreitung von Viruspartikeln. Es ist jedoch noch nicht geklärt inwieweit SO die Ausbreitung begünstigt. Eine Möglichkeit ist über eine direkte oder indirekte Interaktion mit den Viruspartikeln oder viraler Proteine. Weiterhin könnte SO auch über seine Funktion im CWI-Signalweg, durch den die Transkription verschiedener Gene reguliert wird, die Ausbreitung begünstigen. Möglicherweise sorgt aber auch eine vermehrte durch SO vermittelte Hyphenfusion für die effektivere Ausbreitung von Viruspartikeln in die Konidien.

5.8 Fazit

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Ausbreitungseffizienz von Viruspartikeln in Konidien über zwei unabhängige Mechanismen signifikant erhöht werden. Dies ist eine Voraussetzung für die Applikation im Feld.

Ausgegangen wurde von zwei Proteinkandidaten, die in der theoretischen Überlegung die Ausbreitung von Viruspartikeln über ihre Assoziation mit Poren und Septen beeinflussen könnten, das Hex-1 und das SO.

DISKUSSION

Hex-1 hat keinen Einfluss auf die Ausbreitungseffizienz von FgV-ch9, doch spielt es möglicherweise als Gerüstprotein für das Transmembranprotein TmpL eine Rolle in der Regulation der pilzlichen ROS Homöostase, die unter anderem wichtig für Virulenz und Konidienproduktion ist.

Das SO ist in *F. graminearum* höchstwahrscheinlich ein essentieller Bestandteil der Hyphenfusion und des CWI-Signalweges, wodurch es bei einer Deletion des Gens zu einem Defekt in der Bildung von Anastomosen und Infektionsstrukturen kommt. Durch diesen Defekt ist die Virulenz des Pilzes auf Weizen stark reduziert und die Bildung von Perithezien nicht möglich. Auch zeigte sich, dass das Myzel sehr viel weniger intrazelluläre Hyphenverzweigungen ausbilden konnte und virusinfiziertes Myzel schneller wuchs als virusinfiziertes Myzel des Wildtyps. Die Übertragungsrate von Viruspartikeln in Konidien war zudem signifikant reduziert.

Die SO Überexpression hingegen hatte einen positiven Effekt auf die Ausbreitungseffizienz der Viruspartikel und führte zu signifikant mehr infizierten Konidien.

Die Ergebnisse zeigten auch, dass Virus unabhängig von der Expression der beiden Proteine im Myzel jeder einzelnen Kultur ungleich verteilt ist und dass Myzel mit niedrigeren Viruskonzentrationen im Vergleich zu Myzel mit hohen Viruskonzentrationen vermehrt Konidien produziert, die virusinfiziert sind.

Die Ausbreitung und Verteilung von Viruspartikeln unterliegen also einem komplexen und mehrschichtigen Mechanismus, der von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird.

Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist somit ein entscheidender Schritt zu einem potentiell einsatzfähigem Biozidsystem FgV-ch9/*F. graminearum* vollzogen.

6. Zusammenfassung

Der Ascomyzet *Fusarium graminearum* ist der Hauptauslöser der Ährenbleiche bei Weizen (*Fusarium head blight*, FHB), Gerste und Mais (*ear rot*). Der Befall von Nutzpflanzen führt in kurzer Zeit zu einem massiven Ernte- und Qualitätsverlust und die von ihm gebildeten Mykotoxine verursachen bei Menschen und Tieren schwere gesundheitliche Probleme. Die Bekämpfung des Erregers mit Fungiziden ist ineffizient, deswegen ist die Entwicklung von alternativen Kontrollmaßnahmen von hoher Bedeutung. Es ist bekannt, dass die Infektion des Pilzes mit dem *Fusarium graminearum* Virus-china 9 (FgV-ch9, *Chrysoviridae*) aufgrund seines stark reduzierten Wachses zu einer Blockierung der systemischen Ausbreitung des Pilzes führt. Virusinfizierte *Fusarium* Stämme könnten damit als Biozid zum Einsatz als Alternative zu Fungiziden kommen. Idealerweise würden im Feld virusinfizierte Konidien ausgebracht werden. Bei jeder einzelnen dieser Konidien müsste zwingend sichergestellt sein, dass sie das Virus enthalten und wiederum zu Myzel mit reduziertem Wuchs auskeimen. In der vorliegenden Studie wurden unveröffentlichte Daten bestätigt, dass die Konidien, die von virusinfiziertem Myzel produziert wurden, nur zu maximal 35% diese Voraussetzung erfüllen.

Um die Infektionsrate in den Konidien zu erhöhen, wurden zwei Proteine untersucht, die für den verbesserten Transport des Virus in die Konidien verantwortlich sein könnten. Das Hex-1 als der Hauptbestandteil von *Woronin bodies*, die bei mechanischem Stress die septalen Poren verschließen und so das Ausströmen von Zytoplasma verhindern. Das SO und seine Homologe verschließen ebenfalls die septalen Poren, allerdings bei unterschiedlichen Stresstimuli. Zusätzlich spielt SO eine wichtige Rolle in der zellulären Signalübertragung. Mit Deletions- und Überexpressionsmutanten wurde der Einfluss von SO und Hex-1 auf den Einfluss verschiedener Parameter auf den Pilz und insbesondere auf die Rate der virusinfizierten Konidien analysiert.

Es zeigte sich, dass Hex-1 keinen Einfluss auf die Rate der infizierten Konidien hat. Auch weitere Parameter wie die Infektiosität auf Weizen und die Morphologie der Hex-1 Mutanten war nicht vom Wildtyp zu unterscheiden.

Eine Reduktion oder das Fehlen von SO hatte hingegen eine veränderte Morphologie der Pilzkultur und eine Reduktion der Pathogenität auf Weizen zur Folge, welches durch eine Verminderung der Infektionsstrukturen abgeleitet werden kann. Eine Infektion mit dem Virus war in *so*-Deletionsmutanten nicht möglich, was wahrscheinlich mit einer reduzierten Fähigkeit zur Ausbildung von Anastomosen zusammenhängt. Der Umweg

ZUSAMMENFASSUNG

einer SO Expression über einen induzierbaren Promoter im *so*-Deletionshintergrund führte zu einer Virusinfektion, die dann unabhängig von der Expressionsstärke von SO stabil war. Die Infektionsrate der Konidien zeigte eine drastisch erhöhte Effizienz bei einer SO-Überexpression. Gleichzeitig wurde deutlich, dass wahrscheinlich ein zweiter Mechanismus, der von der Viruslast des Ausgangsmyzels abhängt, den Übergang des Virus in die Konidien steuert.

Die Ergebnisse zeigen, dass mit genetischen Anpassungen des Pilzes das Virus FgV-ch9 vermehrt in den Konidien vorhanden ist und damit das System FgV-ch9/*F. graminearum* als Biozid in der Praxis eingesetzt werden könnte.

7. Summary

The ascomycete *Fusarium graminearum* is the main cause of fusarium head blight disease (FHB) in wheat, barley and corn (ear rot). The infection of crops leads to massive yield and quality loss worldwide every year. The mycotoxins produced by the pathogen also cause severe health problems in humans and animals. Besides, control of the pathogen with fungicides is inefficient, therefore the development of alternatives is of high importance.

The infection of the fungus with *Fusarium graminearum* virus-china 9 (FgV-ch9, *Chrysoviridae*) leads to a reduced systemic spread and an overall reduced pathogenicity, called hypovirulence. Therefore, virus-infected *Fusarium* strains could be used as an alternative to fungicides. Ideally, virus-infected conidia would be applied in the field. However, each of these conidia would have to contain the virus and germinate into mycelium with a hypovirulent phenotype. In this study, we confirmed unpublished data that the conidia produced by virus infected mycelium germinate only to 35% into hypovirulent mycelium.

To increase the infection rate, two proteins were identified and analyzed. The Hex-1 and the SO. Hex 1 is the major component of Woronin bodies, which plug septal pores after hyphal wounding to restrict the loss of cytoplasm. SO and its homologs also have pore sealing activity under different stress conditions. Furthermore, SO plays an important role in cell-signaling. Hence, the role of these proteins during virus infection and their influence on transmission efficiency of virus into conidia were analyzed.

This thesis demonstrated that Hex-1 has no effect on the rate of infected conidia. Moreover, Hex-1 showed neither altered phenotype nor altered pathogenicity on wheat. On the other hand, the reduction or absence of SO resulted in an altered phenotype and reduced pathogenicity on wheat. In addition, fewer infection structures were formed and the infection of SO deletion mutants was unsuccessful. This is probably related to the incapability to form anastomoses in absence of SO. However, in a mutant with regulatable SO expression, the virus infection was successful. Subsequently, the virus infection was stable and independent of SO expression levels.

A very interesting result was that the transmission rate of virus into conidia dramatically increased upon SO overexpression. Evidence suggests that another mechanism, dependent on viral load, probably mediates or controls the migration of virus particle into conidia.

SUMMARY

Finally, results showed that with adaptation of the fungus, the transmission efficiency of virus into conidia increases, and thus the FgV-ch9/*F. graminearum* system could be used eventually as a biocide on the field.

8. Literaturverzeichnis

- AGRAVIS** (2023) *Ernte 2023: Prognosen, Berichte, Lösungen: Wann beginnt die Getreideernte?* <https://www.agravis.de/de/pflanzenbau/ernte/>.
- Alberta Agriculture and Forestry** (2020) *Fusarium head blight of barley and wheat*. [Edmonton]: Government of Alberta. 19 pp.
- Ali, S., and L. Francl. (Ed)** (2001) *Progression of Fusarium species on wheat leaves from seedling to adult stages in North Dakota*.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, **25**, 3389–3402.
- Alves M.S., Dadalto S.P., Gonçalves A.B., Souza G.B. de, Barros V.A., Fietto L.G.** (2014) Transcription Factor Functional Protein-Protein Interactions in Plant Defense Responses. *Proteomes*, **2**, 85–106.
- Ayllón M.A., Vainio E.J.** (2023) Mycoviruses as a part of the global virome: Diversity, evolutionary links and lifestyle. *Advances in virus research*, **115**, 1–86.
- Bal G.** (1994) Scab of Wheat: Prospects For Control. *Plant disease*, **78**, 760.
- Bennett J.W., Klich M.** (2003) Mycotoxins. *Clinical microbiology reviews*, **16**, 497–516.
- Blum C.** (2017) *Charakterisierung des Chrysovirus FgV-ch9 aus Fusarium graminearum: Sequenzen, Synthese und Funktion der viralen Proteine*. Dissertation. Hamburg.
- Blum C., Götsch S., Heinze C.** (2017) Duplications in the 3' termini of three segments of Fusarium graminearum virus China 9. *Archives of virology*, **162**, 897–900.
- Boenisch M.J., Schäfer W.** (2011) Fusarium graminearum forms mycotoxin producing infection structures on wheat. *BMC plant biology*, **11**, 110.
- Boguszewska-Chachulska A.M., Haenni A.-L.** (2005) RNA viruses redirect host factors to better amplify their genome. *Advances in virus research*, **65**, 29–61.
- Bormann J., Heinze C., Blum C., Mentges M., Brockmann A., Alder A., Landt S.K., Josephson B., Indenbirken D., Spohn M., Plitzko B., Loesgen S., Freitag M., Schäfer W.** (2018) Expression of a Structural Protein of the Mycovirus FgV-ch9 Negatively Affects the Transcript Level of a Novel Symptom Alleviation Factor and Causes Virus Infection-Like Symptoms in Fusarium graminearum. *Journal of virology*, **92**.
- Braun E.J., Howard R.J.** (1994) Adhesion of fungal spores and germlings to host plant surfaces. *Protoplasma*, **181**, 202–212.

- Brown N.A., Urban M., van de Meene A.M.L., Hammond-Kosack K.E.** (2010) The infection biology of *Fusarium graminearum*: defining the pathways of spikelet to spikelet colonisation in wheat ears. *Fungal biology*, **114**, 555–571.
- Buller A.H.R.** (1909) *Researches on fungi*. London: Longmans, Green.
- Chen H.I., Sudol M.** (1995) The WW domain of Yes-associated protein binds a proline-rich ligand that differs from the consensus established for Src homology 3-binding modules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 7819–7823.
- Chen X., Zaro J.L., Shen W.-C.** (2013) Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Advanced drug delivery reviews*, **65**, 1357–1369.
- Chiba S., Hleibieh K., Delbianco A., Klein E., Ratti C., Ziegler-Graff V., Bouzoubaa S., Gilmer D.** (2013) The benyvirus RNA silencing suppressor is essential for long-distance movement, requires both zinc-finger and NoLS basic residues but not a nucleolar localization for its silencing-suppression activity. *Molecular plant-microbe interactions MPMI*, **26**, 168–181.
- Cho W.K., Yu J., Lee K.-M., Son M., Min K., Lee Y.-W., Kim K.-H.** (2012) Genome-wide expression profiling shows transcriptional reprogramming in *Fusarium graminearum* by *Fusarium graminearum* virus 1-DK21 infection. *BMC Genomics*, **13**, 173.
- Contreras X., Mzoughi O., Gaston F., Peterlin M.B., Bahraoui E.** (2012) Protein kinase C-delta regulates HIV-1 replication at an early post-entry step in macrophages. *Retrovirology*, **9**, 37.
- Craven K.D., Véléz H., Cho Y., Lawrence C.B., Mitchell T.K.** (2008) Anastomosis is required for virulence of the fungal necrotroph *Alternaria brassicicola*. *Eukaryotic cell*, **7**, 675–683.
- Darissa O., Adam G., Schäfer W.** (2012) A dsRNA mycovirus causes hypovirulence of *Fusarium graminearum* to wheat and maize. *Eur J Plant Pathol*, **134**, 181–189.
- Darissa O., Willingmann P., Schäfer W., Adam G.** (2011) A novel double-stranded RNA mycovirus from *Fusarium graminearum*: nucleic acid sequence and genomic structure. *Archives of virology*, **156**, 647–658.
- Daskalov A., Heller J., Herzog S., Fleißner A., Glass N.L.** (2017) Molecular Mechanisms Regulating Cell Fusion and Heterokaryon Formation in Filamentous Fungi. *Microbiology spectrum*, **5**.
- Deepa N., Adkar-Purushothama C.R., Sreenivasa M.Y.** (2021) Molecular technologies for the early detection of fungal phytopathogens associated with cereal crops. In

LITERATURVERZEICHNIS

Microbes in land use change management, pp. 137–154. Eds J. S. Singh, S. Tiwari, C. Singh, and A. K. Singh. Amsterdam, Oxford, Cambridge, MA: Elsevier.

Demarini D.M., Kurtzman C.P., Fennell D.I., Worden K.A., Detroy R.W. (1977) Transmission of PsV-F and PsV-S Mycoviruses during Conidiogenesis of *Penicillium stoloniferum*. *Journal of General Microbiology*, **100**, 59–64.

Deng F., Xu R., Boland G.J. (2003) Hypovirulence-Associated Double-Stranded RNA from *Sclerotinia homoeocarpa* Is Conspecific with *Ophiostoma novo-ulmi* Mitovirus 3a-Ld. *Phytopathology*, **93**, 1407–1414.

Deutscher Bauernverband (2023) 2. Ernteschätzung des DBV: Regen bremst die Mähdrescher aus: <https://www.agrar-presseportal.de/landwirtschaft/pflanze/2-ernteschaetzung-des-dbv-regen-bremst-die-maehdrescher-aus-37056.html>. ID: 37056. Berlin, Deutschland.

Deutscher Wetterdienst (2023) Deutschlandwetter im Juli 2023: https://www.dwd.de/DE/presse/pressemitteilungen/DE/2023/20230731_deutschlandwetter_juli2023_news.html.

Donaire L., Rozas J., Ayllón M.A. (2016) Molecular characterization of *Botrytis ourmia*-like virus, a mycovirus close to the plant pathogenic genus *Ourmiavirus*. *Virology*, **489**, 158–164.

Dufossé L., Caro Y., Fouillaud M. (2018) *Fungal Pigments*. Erscheinungsort nicht ermittelbar: MDPI - Multidisciplinary Digital Publishing Institute. 134 pp.

El-Nezami H., Polychronaki N., Salminen S., Mykkänen H. (2002) Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-Grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative (') α -earalenol. *Applied and environmental microbiology*, **68**, 3545–3549.

Engl I., Würtz C., Witzel-Schlömp K., Zhang H.Y., Hoff B., Nowrousian M., Rottensteiner H., Kück U. (2007) The WW domain protein PRO40 is required for fungal fertility and associates with Woronin bodies. *Eukaryotic cell*, **6**, 831–843.

Eusebio-Cope A., Sun L., Hillman B.I., Suzuki N. (2010) Mycoreovirus 1 S4-coded protein is dispensable for viral replication but necessary for efficient vertical transmission and normal symptom induction. *Virology*, **397**, 399–408.

Fang Y.-L., Xia L.-M., Wang P., Zhu L.-H., Ye J.-R., Huang L. (2018) The MAPKKK CgMck1 Is Required for Cell Wall Integrity, Appressorium Development, and Pathogenicity in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Genes*, **9**.

- Ferriol I., Rubio L., Pérez-Panadés J., Carbonell E.A., Davino S., Belliure B.** (2013) Transmissibility of Broad bean wilt virus 1 by aphids: influence of virus accumulation in plants, virus genotype and aphid species. *Ann Appl Biol*, **162**, 71–79.
- Fimia G.M., Evangelisti C., Alonzi T., Romani M., Fratini F., Paonessa G., Ippolito G., Tripodi M., Piacentini M.** (2004) Conventional protein kinase C inhibition prevents alpha interferon-mediated hepatitis C virus replicon clearance by impairing STAT activation. *Journal of virology*, **78**, 12809–12816.
- Fischer M.S., Glass N.L.** (2019) Communicate and Fuse: How Filamentous Fungi Establish and Maintain an Interconnected Mycelial Network: How Filamentous Fungi Establish and Maintain an Interconnected Mycelial Network. *Frontiers in microbiology*, **10**, 619.
- Fisher M.C., Henk D.A., Briggs C.J., Brownstein J.S., Madoff L.C., McCraw S.L., Gurr S.J.** (2012) Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, **484**, 186–194.
- Fleissner A., Glass N.L.** (2007) SO, a protein involved in hyphal fusion in *Neurospora crassa*, localizes to septal plugs. *Eukaryotic cell*, **6**, 84–94.
- Fleißner A., Herzog S.** (2016) Signal exchange and integration during self-fusion in filamentous fungi. *Seminars in cell & developmental biology*, **57**, 76–83.
- Fleissner A., Leeder A.C., Roca M.G., Read N.D., Glass N.L.** (2009) Oscillatory recruitment of signaling proteins to cell tips promotes coordinated behavior during cell fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 19387–19392.
- Fleissner A., Sarkar S., Jacobson D.J., Roca M.G., Read N.D., Glass N.L.** (2005) The so locus is required for vegetative cell fusion and postfertilization events in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic cell*, **4**, 920–930.
- Frandsen R.J.N., Nielsen N.J., Maolanon N., Sørensen J.C., Olsson S., Nielsen J., Giese H.** (2006) The biosynthetic pathway for aurofusarin in *Fusarium graminearum* reveals a close link between the naphthoquinones and naphthopyrones. *Molecular microbiology*, **61**, 1069–1080.
- Fu T., Kang S.W., Song Y.-W., Kim K.S.** (2023) The Cell Wall Integrity MAP Kinase Signaling Pathway Is Required for Development, Pathogenicity, and Stress Adaption of the Pepper Anthracnose Fungus *Colletotrichum scovillei*. *Mycobiology*, **51**, 178–185.
- Gaffar F.Y., Imani J., Karlovsky P., Koch A., Kogel K.-H.** (2019) *Different components of the RNAi machinery are required for conidiation, ascosporeogenesis, virulence, DON*

LITERATURVERZEICHNIS

production and fungal inhibition by exogenous dsRNA in the Head Blight pathogen Fusarium graminearum.

- Ghabrial S.A.** (1998) Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. *Virus genes*, **16**, 119–131.
- Ghabrial S.A., Castón J.R., Jiang D., Nibert M.L., Suzuki N.** (2015) 50-plus years of fungal viruses. *Virology*, **479-480**, 356–368.
- Ghabrial S.A., Suzuki N.** (2009) Viruses of plant pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **47**, 353–384.
- Gilbert J., Fernando W.G.D.** (2004) Epidemiology and biological control of Gibberella zeae / Fusarium graminearum. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **26**, 464–472.
- Goryachev A.B., Lichius A., Wright G.D., Read N.D.** (2012) Excitable behavior can explain the "ping-pong" mode of communication between cells using the same chemoattractant. *Bioessays*, **34**, 259–266.
- Goswami R.S., Kistler H.C.** (2004) Heading for disaster: Fusarium graminearum on cereal crops. *Molecular plant pathology*, **5**, 515–525.
- Gray S.M.** (1991) Aphid Transmission of Barley Yellow Dwarf Virus: Acquisition Access Periods and Virus Concentration Requirements. *Phytopathology*, **81**, 539.
- Guenther J.C., Trail F.** (2005) The development and differentiation of Gibberella zeae (anamorph: Fusarium graminearum) during colonization of wheat. *Mycologia*, **97**, 229–237.
- Guerra S., López-Fernández L.A., Pascual-Montano A., Muñoz M., Harshman K., Esteban M.** (2003) Cellular gene expression survey of vaccinia virus infection of human HeLa cells. *Journal of virology*, **77**, 6493–6506.
- Guo L., Wenner N., Kuldau G.A.** (2015) FvSO regulates vegetative hyphal fusion, asexual growth, fumonisin B1 production, and virulence in Fusarium verticillioides. *Fungal biology*, **119**, 1158–1169.
- Haj Hammadeh H., Serrano A., Wernet V., Stomberg N., Hellmeier D., Weichert M., Brandt U., Sieg B., Kanofsky K., Hehl R., Fischer R., Fleißner A.** (2022) A dialogue-like cell communication mechanism is conserved in filamentous ascomycete fungi and mediates interspecies interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **119**, e2112518119.
- Hansen D.R., van Alfen N.K., Gillies K., Powell W.A.** (1985) Naked dsRNA Associated with Hypovirulence of Endothia parasitica Is Packaged in Fungal Vesicles. *Journal of General Virology*, **66**, 2605–2614.

LITERATURVERZEICHNIS

- Heiniger U.** (2007) Biologische Bekämpfung des Kastanienrindenkrebsses auf der Alpennordseite der Schweiz|Biological control of chestnut blight north of the Swiss Alps. *Schweizerische Zeitschrift für Forstwesen*, **158**, 342–348.
- Heiniger U., Rigling D.** (1994) BIOLOGICAL CONTROL OF CHESTNUT BLIGHT IN EUROPE. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **32**, 581–599.
- Heinisch J.J., Rodicio R.** (2018) Protein kinase C in fungi-more than just cell wall integrity. *FEMS Microbiology Reviews*, **42**, 20977.
- Hellemans J., Mortier G., Paepe A. de, Speleman F., Vandesompele J.** (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome biology*, **8**, R19.
- Herzog S., Schumann M.R., Fleißner A.** (2015) Cell fusion in *Neurospora crassa*. *Current opinion in microbiology*, **28**, 53–59.
- Hickey P.C., Jacobson D., Read N.D., Glass N.L.** (2002) Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal genetics and biology FG & B*, **37**, 109–119.
- Hillman B.I., Suzuki N.** (2004) Viruses of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Advances in virus research*, **63**, 423–472.
- Hollings M., Stone O.M.** (1969) Viruses in fungi. *Science Progress (1933-)*, **57**, 371–391.
- Hollings M.** (1962) Viruses Associated with A Die-Back Disease of Cultivated Mushroom. *Nature*, **196**, 962–965.
- Honda S., Eusebio-Cope A., Miyashita S., Yokoyama A., Aulia A., Shahi S., Kondo H., Suzuki N.** (2020) Establishment of *Neurospora crassa* as a model organism for fungal virology. *Nature communications*, **11**, 5627.
- Huang H.-T., Maruyama J.-I., Kitamoto K.** (2013) *Aspergillus oryzae* AoSO is a novel component of stress granules upon heat stress in filamentous fungi. *PloS one*, **8**, e72209.
- Jackson A.O., Larkins B.A.** (1976) Influence of Ionic Strength, pH, and Chelation of Divalent Metals on Isolation of Polyribosomes from Tobacco Leaves. *Plant physiology*, **57**, 5–10.
- Jansen C., Wettstein D. von, Schäfer W., Kogel K.-H., Felk A., Maier F.J.** (2005) Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 16892–16897.
- Jedd G.** (2011) Fungal evo-devo: organelles and multicellular complexity. *Trends in cell biology*, **21**, 12–19.

- Jedd G., Chua N.H.** (2000) A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane. *Nature cell biology*, **2**, 226–231.
- Jeon J., Goh J., Yoo S., Chi M.-H., Choi J., Rho H.-S., Park J., Han S.-S., Kim B.R., Park S.-Y., Kim S., Lee Y.-H.** (2008) A putative MAP kinase kinase kinase, MCK1, is required for cell wall integrity and pathogenicity of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Molecular plant-microbe interactions MPMI*, **21**, 525–534.
- Jiang D., Fu Y., Guoqing L., Ghabrial S.A.** (2013) Viruses of the plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Advances in virus research*, **86**, 215–248.
- Jones D.T., Taylor W.R., Thornton J.M.** (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer applications in the biosciences CABIOS*, **8**, 275–282.
- Jones R.K.** (2000) Assessments of Fusarium Head Blight of Wheat and Barley in Response to Fungicide Treatment. *Plant disease*, **84**, 1021–1030.
- Joshi S., Haenni A.-L.** (1984) Plant RNA viruses: strategies of expression and regulation of Viral Genes. *FEBS letters*, **177**, 163–174.
- Kang Z., Buchenauer H.** (2000) Cytology and ultrastructure of the infection of wheat spikes by *Fusarium culmorum*. *Mycological Research*, **104**, 1083–1093.
- Kim K.-H., Willger S.D., Park S.-W., Puttikamonkul S., Grahl N., Cho Y., Mukhopadhyay B., Cramer R.A., Lawrence C.B.** (2009) TmpL, a transmembrane protein required for intracellular redox homeostasis and virulence in a plant and an animal fungal pathogen. *PLoS Pathog*, **5**, e1000653.
- Klittich C., Leslie J.F.** (1988) Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). *Genetics*, **118**, 417–423.
- Kumar R., Khandelwal N., Thachamvally R., Tripathi B.N., Barua S., Kashyap S.K., Maherchandani S., Kumar N.** (2018a) Role of MAPK/MNK1 signaling in virus replication. *Virus research*, **253**, 48–61.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K.** (2018b) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular biology and evolution*, **35**, 1547–1549.
- Kwon S.-J., Lim W.-S., Park S.-H., Park, Mi-Ri, and Kim, Kook-Hyung** (2007) Molecular Characterization of a dsRNA Mycovirus, *Fusarium graminearum* Virus-DK21, which Is Phylogenetically Related to Hypoviruses but Has a Genome Organization and Gene Expression Strategy Resembling Those of Plant Potex-like Viruses. *Mol. Cells*, **23**, 304–315.

- Kyrychenko A.N., Tsyganenko K.S., Olishavska S.V.** (2018) Hypovirulence of Mycoviruses as a Tool for Biotechnological Control of Phytopathogenic Fungi. *Cytol. Genet.*, **52**, 374–384.
- Lee K.-M., Cho W.K., Yu J., Son M., Choi H., Min K., Lee Y.-W., Kim K.-H.** (2014) A comparison of transcriptional patterns and mycological phenotypes following infection of *Fusarium graminearum* by four mycoviruses. *PLoS one*, **9**, e100989.
- Lew R.R.** (2005) Mass flow and pressure-driven hyphal extension in *Neurospora crassa*. *Microbiology (Reading, England)*, **151**, 2685–2692.
- Lichius A., Yáñez-Gutiérrez M.E., Read N.D., Castro-Longoria E.** (2012) Comparative live-cell imaging analyses of SPA-2, BUD-6 and BNI-1 in *Neurospora crassa* reveal novel features of the filamentous fungal polarisome. *PLoS one*, **7**, e30372.
- Liu F., Ng S.K., Lu Y., Low W., Lai J., Jedd G.** (2008) Making two organelles from one: Woronin body biogenesis by peroxisomal protein sorting. *The Journal of cell biology*, **180**, 325–339.
- Liu N., Fan F., Qiu D., Jiang L.** (2013) The transcription cofactor FgSwi6 plays a role in growth and development, carbendazim sensitivity, cellulose utilization, lithium tolerance, deoxynivalenol production and virulence in the filamentous fungus *Fusarium graminearum*. *Fungal genetics and biology FG & B*, **58-59**, 42–52.
- Liu S., Xie J., Cheng J., Li B., Chen T., Fu Y., Li G., Wang M., Jin H., Wan H., Jiang D.** (2016) Fungal DNA virus infects a mycophagous insect and utilizes it as a transmission vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **113**, 12803–12808.
- Lutz T., Petersen J.M., Yanık C., Oliveira C. de, Heinze C.** (2021) Processing of the capsid proteins of the Betachrysovirus *Fusarium graminearum* virus-China 9 (FgV-ch9). *Virology*, **563**, 50–57.
- Maier F.J., Miedaner T., Hadelers B., Felk A., Salomon S., Lemmens M., Kassner H., Schäfer W.** (2006) Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (Tri5) gene in three field isolates of different chemotype and virulence. *Molecular plant pathology*, **7**, 449–461.
- Malz S., Grell M.N., Thrane C., Maier F.J., Rosager P., Felk A., Albertsen K.S., Salomon S., Bohn L., Schäfer W., Giese H.** (2005) Identification of a gene cluster responsible for the biosynthesis of aurofusarin in the *Fusarium graminearum* species complex. *Fungal Genetics and Biology*, **42**, 420–433.

LITERATURVERZEICHNIS

- Markham P., Collinge A.J.** (1987) Woronin bodies of filamentous fungi. *FEMS Microbiology Letters*, **46**, 1–11.
- Martin R.M., van Alfen N.K.** (1991) The movement of viral-like RNA between colonies of *Cryphonectria parasitica*. *Molecular plant-microbe interactions*, **4**, 507–511.
- Maruthachalam K., van den Berg M.A. (Eds)** (2015) *Genetic Transformation Systems in Fungi, Volume 2*. SpringerLink Bücher. Cham, s.l.: Springer International Publishing.
- Maruyama J.-I., Escaño C.S., Kitamoto K.** (2010) AoSO protein accumulates at the septal pore in response to various stresses in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Biochemical and biophysical research communications*, **391**, 868–873.
- McMullen M., Jones R., Gallenberg D.** (1997) Scab of Wheat and Barley: A Re-emerging Disease of Devastating Impact. *Plant disease*, **81**, 1340–1348.
- Mendgen K., Hahn M., Deising H.** (1996) Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **34**, 367–386.
- Mérai Z., Kerényi Z., Molnár A., Barta E., Válóczy A., Bisztray G., Havelda Z., Burgyán J., Silhavy D.** (2005) Aureusvirus P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNAs without size specificity. *Journal of virology*, **79**, 7217–7226.
- Merdekawati C.** (2023) *Phenotypical Analysis of Fusarium graminearum hex1 Mutants upon Mycovirus FgV ch9 Infection*. Masterarbeit. Hamburg. 73 pp.
- Momany M., Richardson E.A., van Sickle C., Jedd G.** (2002) Mapping Woronin body position in *Aspergillus nidulans*. *Mycologia*, **94**, 260–266.
- Morton A.G.** (1961) The induction of sporulation in mould fungi. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **153**, 548–569.
- Mullaney E.J., Hamer J.E., Roberti K.A., Yelton M.M., Timberlake W.E.** (1985) Primary structure of the *trpC* gene from *Aspergillus nidulans*. *Molecular & general genetics MGG*, **199**, 37–45.
- Myers J.M., James T.Y.** (2022) Mycoviruses. *Current biology CB*, **32**, R150–R155.
- Namiki F., Matsunaga M., Okuda M., Inoue I., Nishi K., Fujita Y., Tsuge T.** (2001) Mutation of an arginine biosynthesis gene causes reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Molecular plant-microbe interactions MPMI*, **14**, 580–584.
- Navarro-Bordonaba J., Adams T.H.** (1994) Development of Conidia and Fruiting Bodies in Ascomycetes. In *Growth, differentiation and sexuality*, 1st ed. 1994. The Mycota

LITERATURVERZEICHNIS

Volume 1, pp. 333–349. Eds J. G. H. Wessels and F. Meinhardt. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.

- Nazarov P.A., Baleev D.N., Ivanova M.I., Sokolova L.M., Karakozova M.V.** (2020) Infectious Plant Diseases: Etiology, Current Status, Problems and Prospects in Plant Protection. *Acta naturae*, **12**, 46–59.
- Ng S.K., Liu F., Lai J., Low W., Jedd G.** (2009) A tether for Woronin body inheritance is associated with evolutionary variation in organelle positioning. *PLoS genetics*, **5**, e1000521.
- Nuss D.L.** (1992) Biological control of chestnut blight: an example of virus-mediated attenuation of fungal pathogenesis. *Microbiological reviews*, **56**, 561–576.
- Nuss D.L.** (2005) Hypovirulence: mycoviruses at the fungal-plant interface. *Nature reviews. Microbiology*, **3**, 632–642.
- Ohara T., Inoue I., Namiki F., Kunoh H., Tsuge T.** (2004) REN1 is required for development of microconidia and macroconidia, but not of chlamydospores, in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Genetics*, **166**, 113–124.
- Park M., Cho Y.-J., Kim D., Yang C.-S., Lee S.M., Dawson T.L., Nakamizo S., Kabashima K., Lee Y.W., Jung W.H.** (2020) A Novel Virus Alters Gene Expression and Vacuolar Morphology in *Malassezia* Cells and Induces a TLR3-Mediated Inflammatory Immune Response. *mBio*, **11**.
- Pearson M.N., Beever R.E., Boine B., Arthur K.** (2009) Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. *Molecular plant pathology*, **10**, 115–128.
- Polashock J.J., Bedker P.J., Hillman B.I.** (1997) Movement of a small mitochondrial double-stranded RNA element of *Cryphonectria parasitica*: ascospore inheritance and implications for mitochondrial recombination. *Molecular & general genetics MGG*, **256**, 566–571.
- Ponts N.** (2015) Mycotoxins are a component of *Fusarium graminearum* stress-response system. *Frontiers in microbiology*, **6**, 1234.
- Proctor R.H., Hohn T.M., McCormick S.P.** (1995) Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Molecular plant-microbe interactions MPMI*, **8**, 593–601.
- Rajani K.R., Pettit Kneller E.L., McKenzie M.O., Horita D.A., Chou J.W., Lyles D.S.** (2012) Complexes of vesicular stomatitis virus matrix protein with host Rae1 and Nup98 involved in inhibition of host transcription. *PLoS Pathog*, **8**, e1002929.

- Ribichich K.F., Lopez S.E., Vegetti A.C.** (2000) Histopathological Spikelet Changes Produced by *Fusarium graminearum* in Susceptible and Resistant Wheat Cultivars. *Plant disease*, **84**, 794–802.
- Rice A.P., Roberts B.E.** (1983) Vaccinia virus induces cellular mRNA degradation. *Journal of virology*, **47**, 529–539.
- Roca M.G., Arlt J., Jeffree C.E., Read N.D.** (2005) Cell biology of conidial anastomosis tubes in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic cell*, **4**, 911–919.
- Rott M.E., Jelkmann W.** (2001) Detection and Partial Characterization of a Second Closterovirus Associated with Little Cherry Disease, Little cherry virus-2. *Phytopathology*, **91**, 261–267.
- Segers G.C., van Wezel R., Zhang X., Hong Y., Nuss D.L.** (2006) Hypovirus papain-like protease p29 suppresses RNA silencing in the natural fungal host and in a heterologous plant system. *Eukaryotic cell*, **5**, 896–904.
- Shu X., Shaner N.C., Yarbrough C.A., Tsien R.Y., Remington S.J.** (2006) Novel chromophores and buried charges control color in mFruits. *Biochemistry*, **45**, 9639–9647.
- Singh A., Kumar P.K.R., Schügerl K.** (1992) Bioconversion of cellulosic materials to ethanol by filamentous fungi. In *Enzymes and products from bacteria fungi and plant cells*. Advances in biochemical engineering, biotechnology 45, pp. 29–55. Eds T. Coolbear and R. M. Daniel. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Son M., Choi H., Kim K.-H.** (2016) Specific binding of *Fusarium graminearum* Hex1 protein to untranslated regions of the genomic RNA of *Fusarium graminearum* virus 1 correlates with increased accumulation of both strands of viral RNA. *Virology*, **489**, 202–211.
- Son M., Lee K.-M., Yu J., Kang M., Park J.M., Kwon S.-J., Kim K.-H.** (2013) The HEX1 gene of *Fusarium graminearum* is required for fungal asexual reproduction and pathogenesis and for efficient viral RNA accumulation of *Fusarium graminearum* virus 1. *Journal of virology*, **87**, 10356–10367.
- Soundararajan S., Jedd G., Li X., Ramos-Pamploña M., Chua N.H., Naqvi N.I.** (2004) Woronin body function in *Magnaporthe grisea* is essential for efficient pathogenesis and for survival during nitrogen starvation stress. *The Plant Cell*, **16**, 1564–1574.
- Steiner B., Buerstmayr M., Michel S., Schweiger W., Lemmens M., Buerstmayr H.** (2017) Breeding strategies and advances in line selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Trop. plant pathol.*, **42**, 165–174.

- Stukenbrock E., Gurr S.** (2023) Address the growing urgency of fungal disease in crops. *Nature*, **617**, 31–34.
- Su H.-L., Liao C.-L., Lin Y.-L.** (2002) Japanese encephalitis virus infection initiates endoplasmic reticulum stress and an unfolded protein response. *Journal of virology*, **76**, 4162–4171.
- Suzaki K., Ikeda K., Sasaki A., Kanematsu S., Matsumoto N., Yoshida K.** (2005) Horizontal transmission and host-virulence attenuation of totivirus in violet root rot fungus *Helicobasidium mompa*. *J Gen Plant Pathol*, **71**, 161–168.
- Suzuki N., Maruyama K., Moriyama M., Nuss D.L.** (2003) Hypovirus papain-like protease p29 functions in trans to enhance viral double-stranded RNA accumulation and vertical transmission. *Journal of virology*, **77**, 11697–11707.
- Tebbi C.K.** (2023) Mycoviruses in Fungi: Carcinogenesis of Fungal Agents May Not Always Be Mycotoxin Related. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, **9**.
- Teichert I., Steffens E.K., Schnaß N., Fränzel B., Krisp C., Wolters D.A., Kück U.** (2014) PRO40 is a scaffold protein of the cell wall integrity pathway, linking the MAP kinase module to the upstream activator protein kinase C. *PLoS genetics*, **10**, e1004582.
- Trail F.** (2009) For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era. *Plant physiology*, **149**, 103–110.
- van den Broeke C., Jacob T., Favoreel H.W.** (2014) Rho'ing in and out of cells: viral interactions with Rho GTPase signaling. *Small GTPases*, **5**, e28318.
- Vreede F.T., Fodor E.** (2010) The role of the influenza virus RNA polymerase in host shut-off. *Virulence*, **1**, 436–439.
- Walsh D., Mohr I.** (2011) Viral subversion of the host protein synthesis machinery. *Nature reviews. Microbiology*, **9**, 860–875.
- Wang S., Li H., Chen Y., Wei H., Gao G.F., Liu H., Huang S., Chen J.-L.** (2012) Transport of influenza virus neuraminidase (NA) to host cell surface is regulated by ARHGAP21 and Cdc42 proteins. *The Journal of biological chemistry*, **287**, 9804–9816.
- Weber F.J., Tramper J., Rinzema A.** (1999) A simplified material and energy balance approach for process development and scale-up of *Coniothyrium minitans* conidia production by solid-state cultivation in a packed-bed reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, **65**, 447–458.
- Weichert M., Lichius A., Priegnitz B.-E., Brandt U., Gottschalk J., Nawrath T., Groenhagen U., Read N.D., Schulz S., Fleißner A.** (2016) Accumulation of specific sterol precursors targets a MAP kinase cascade mediating cell-cell recognition and

LITERATURVERZEICHNIS

- fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **113**, 11877–11882.
- Wilson W., Dahl B., Nganje W.** (2018) Economic costs of Fusarium Head Blight, scab and deoxynivalenol. *World Mycotoxin Journal*, **11**, 291–302.
- Xie J., Jiang D.** (2014) New insights into mycoviruses and exploration for the biological control of crop fungal diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **52**, 45–68.
- Xu J.R., Staiger C.J., Hamer J.E.** (1998) Inactivation of the mitogen-activated protein kinase Mps1 from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defense responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 12713–12718.
- Xu M., Cho E., Burch-Smith T.M., Zambryski P.C.** (2012) Plasmodesmata formation and cell-to-cell transport are reduced in decreased size exclusion limit 1 during embryogenesis in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 5098–5103.
- XU A., JAO D.L.-E., CHEN K.Y.** (2004) Identification of mRNA that binds to eukaryotic initiation factor 5A by affinity co-purification and differential display. *The Biochemical journal*, **384**, 585–590.
- Yaegashi H., Sawahata T., Ito T., Kanematsu S.** (2011) A novel colony-print immunoassay reveals differential patterns of distribution and horizontal transmission of four unrelated mycoviruses in *Rosellinia necatrix*. *Virology*, **409**, 280–289.
- Yaegashi H., Yoshikawa N., Ito T., Kanematsu S.** (2013) A mycoreovirus suppresses RNA silencing in the white root rot fungus, *Rosellinia necatrix*. *Virology*, **444**, 409–416.
- Yang M., May W.S., Ito T.** (1999) JAZ requires the double-stranded RNA-binding zinc finger motifs for nuclear localization. *The Journal of biological chemistry*, **274**, 27399–27406.
- Ye K., Malinina L., Patel D.J.** (2003) Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature*, **426**, 874–878.
- Yoshida M., Nakajima T., Arai M., Suzuki F., Tomimura K.** (2008) Effect of the Timing of Fungicide Application on Fusarium Head Blight and Mycotoxin Accumulation in Closed-Flowering Barley. *Plant disease*, **92**, 1164–1170.
- Yu J., Kim K.-H.** (2021) A Phenome-Wide Association Study of the Effects of Fusarium graminearum Transcription Factors on Fusarium Graminearum Virus 1 Infection. *Frontiers in microbiology*, **12**, 622261.

LITERATURVERZEICHNIS

- Yu J., Park J.Y., Heo J.-I., Kim K.-H.** (2020) The ORF2 protein of *Fusarium graminearum* virus 1 suppresses the transcription of FgDICER2 and FgAGO1 to limit host antiviral defences. *Molecular plant pathology*, **21**, 230–243.
- Yu X., Li B., Fu Y., Xie J., Cheng J., Ghabrial S.A., Li G., Yi X., Jiang D.** (2013) Extracellular transmission of a DNA mycovirus and its use as a natural fungicide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 1452–1457.
- Yuan P., Jedd G., Kumaran D., Swaminathan S., Shio H., Hewitt D., Chua N.-H., Swaminathan K.** (2003) A HEX-1 crystal lattice required for Woronin body function in *Neurospora crassa*. *Nature structural biology*, **10**, 264–270.
- Zhang L., Luo P., Ren Z., Zhang H.** (2011) Controlling fusarium head blight of wheat (*triticum aestivum* L.) with genetics. *ABB*,

9. Anhang

Anhang 1: Proteinsequenzen

Anhang 1 A: Proteinsequenz XP_011319991.1. Das Hex-1 Protein ist hervorgehoben.

```

1  mgvrygskae  rsgqdtwera  glgkrghngs  tercaaegat  qqtvtetkth  eeveikpqqp
61  eagregeiss  vsvtaekvpp  prseseyiee  evhitreeeh  yhrpgvkhye  hdeehftvre
121 dsrrpqpssq  yqpsqyhqps  hhqpppkfqs  shthveidth  rhyyystpid  laereyrqry
181 rpaqafsted  psshshphyk  pqdnfkanny  tvegrpapqf  yssekteddinn  ftvddrssrp
241 qynhtektei  nnftvdsrss  rpqyntcekt  einnftvdtr  ssqpryrds  ttqvntysvd
301 kpvsrpsykk  dvrftektve  ssksdnkskm  gyydegsfr  nggihklgdk  sreieidire
361 tsgpasspnt  vsipchhirl  gdflmlqgrp  cqvirstss  atggyrylgv  dlftkqlhee
421 ssfisnpaps  vvvqsmgqv  fkgyrvldmq  egqivamtet  gdvkgqlpvi  dqsnlysrh
481 nafesgrgsv  rvtvlndggr  elavdmkvi  gsrl

```

Anhang 1B: Proteinsequenz SO in *F.graminearum* (EYB27695.1).

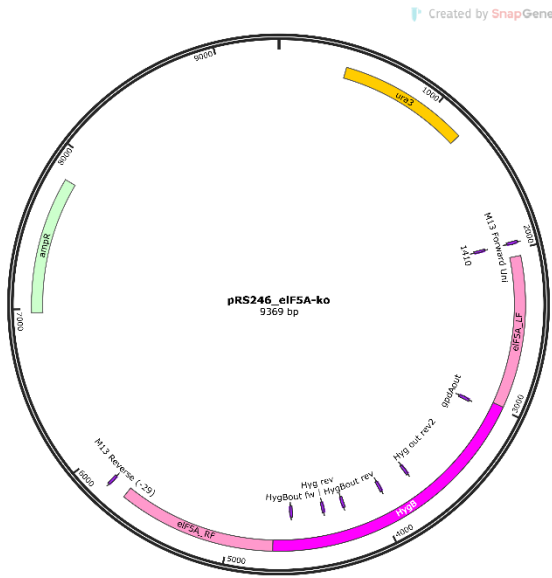
```

1  mersrgvpee  emflnkpape  dcdsptvepl  rifkqspqp  prdgrssafr  ypappsstsp
61  vsqhsfplpp  gasssaaplp  fpdddvdvrk  tpakpfgsay  ndtsprlets  phgkkpglae
121 rrgaapkpi  sptspdadhd  lfqrpladsq  rdssnanyh  nyqktyyppp  gaassssna
181 ptnlapaqq  kmndqgvnrf  astaststtr  asrgsppppe  tpvvepgqap  adaiearyaa
241 agisgtatln  slgapsaaas  qrlaqygnqp  ppqrpwtpte  tpdqapsqpp  tvyqgmna  is
301 spaqshqsfs  pppqseqqpq  qkpqqgggqa  gqaqvsvleq  dfqrmntnsp  ppaysslpgg
361 gnssypnekq  rpqqagsssa  sasshqpat  stptkttvia  apstaasgla  spalqhpghp
421 afandphpaf  anesrpeqng  qssqqqvvp  aqtfepqnpa  sppplpegwi  ahldqnsqgy
481 yyihlatqat  qwefpkgnp  isheqapls  tastygnpla  spnmfgkqsm  aspmfpphtp
541 gyaesimsva  asatptaagf  tgpppsagvd  myriqptngv  yfgpylryvn  mdiekglwlg
601 silivtdapq  pptihihlsh  dlapnrqae  prpifthqrw  kfykydlelp  mseagterwt
661 yavtshlgct  ryefvvagrq  etswrfiahs  gndfaagtsq  neraklggvg  fmwkdvqlkn
721 vdcggfhvql  glgdqiyygdr  lwkevpllkq  wlamsgrdnk  knvqwtarhe  edvahayfhy
781 ytshfdqpf  reafaqiphv  lqiddhdifd  gygsypdymq  sspmfnigr  iatemyllfq
841 hhttvemlrn  vstdhdifti  tgtgwhfvky  lgpavvvvgp  dcrsertqaq  vmagptyggi
901 fpkvatlp  vqhciwmvsv  plvyprldtv  eslantmaag  kkavnttyni  lgkvtssvag
961 vvggkdvvaq  gfsqvkkavg  ktglmgvnl  qfgeldiqev  lkdmwthdtk  dlertylirt
1021 lqgisqqkgi  rmtflsgdvn  asgaglvhdp  thpgdhktmy  qiisspivaa  pqsnyvlkml
1081 hnqktlyvpq  ngkksthevs  dtkedmmeif  hsdasgaare  lkklmgrny  vafvsydqda
1141 aaavpqt pfs  pnpslngsq  glskvslavd  fvvqgdgaft  aptkygpvii  phleygr

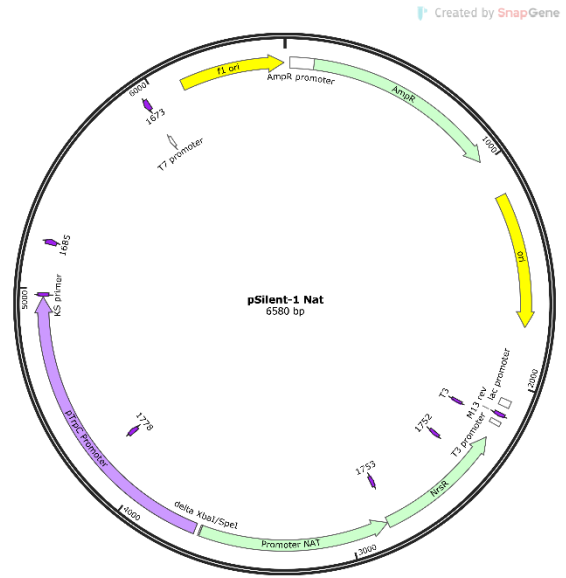
```

ANHANG

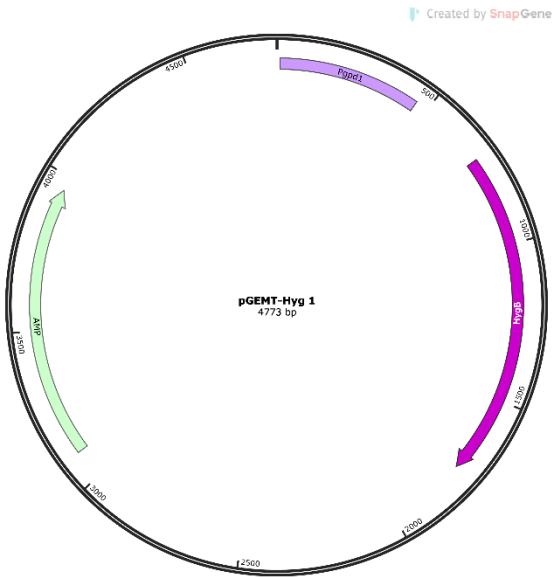
Anhang 2: Vektorkarten der verwendeten und erstellten Konstrukte



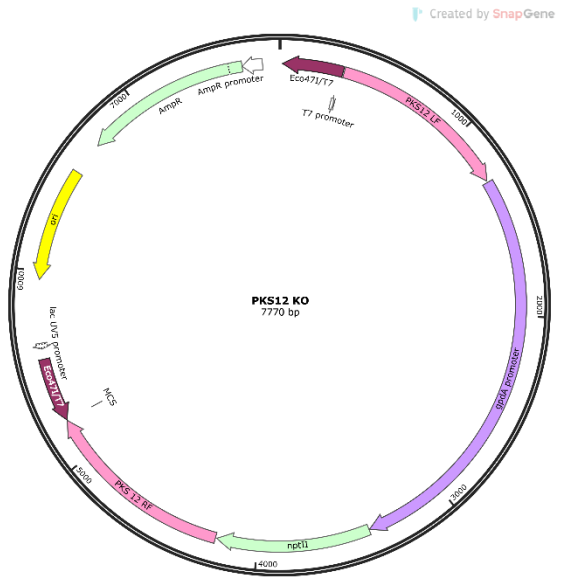
Anhang 2A: pRS246_elf5A-ko, pGEM-T Vektor beinhaltet das hex-1 Knockout-Konstrukt



Anhang 2B: pSilent-1 NAT mit TrpC Promoter und NAT Resistenzkassette

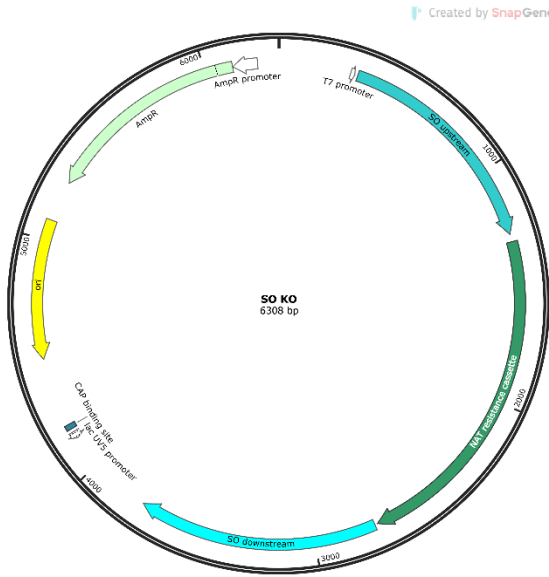


Anhang 2C: pGEM-T HygB, pGEM-T Vektor mit HygB Resistenzkassette



Anhang 2D: pks12 Knockout Konstrukt in pJET

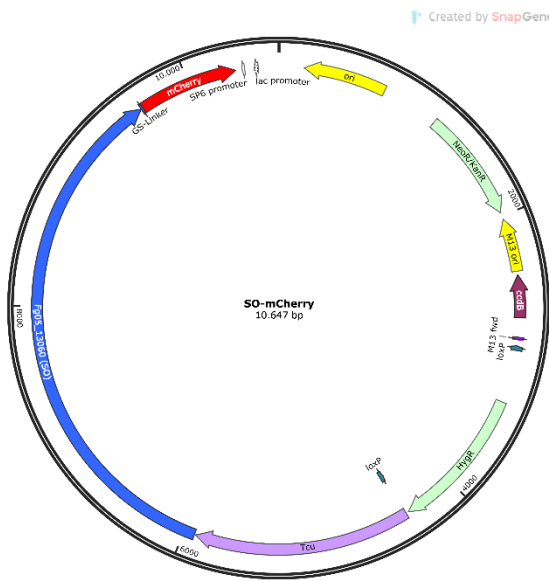
ANHANG



Anhang 2E: so Knockout Konstrukt in pJET



Anhang 2F: eGFP-Hex-1 Überexpression in pSilent NAT



Anhang 2G: SO-mCherry Überexpression in pBJ-1



Anhang 2H: SO-mCherry Komplementation in pJET

ANHANG

Anhang 3: ELISA Daten

Anhang 3A: ELISA Rohdaten zur Berechnung der Eichgerade

Absorption (405 nm)					
Mittelwert Negativkontrolle	Wert Probe	Verdünnung	Korrigierter Wert	Mittelwert korrigiert	Normalisiert in %
0.165	1.078	1:250	0.931	0.986	100
	1.227		1.062		
	1.140		0.975		
	0.765	1:500	0.600	0.607	61
	0.804		0.639		
	0.758		0.593		
	0.239	1:1000	0.074	0.084	8
	0.228		0.063		
	0.268		0.103		
	0.153	1:5000	-0.012	0.009	0
	0.193		0.028		
	0.168		0.003		

Anhang 3B: ELISA Rohdaten Virusverteilung

Absorption (405 nm)							
Mittelwert Negativkontrolle	Wert Probe	Korrigierter Wert	Mittelwert korrigiert	Normalisiert auf Eichgerade in %			
0.166	0.503	0.337	0.380	29	FgApks12		
	0.532	0.366					
	0.602	0.436					
0.165	0.579	0.414	0.503	48		FgApks12	
	0.65	0.485					
	0.785	0.62					
0.165	0.495	0.33	0.381	35			FgApks12
	0.516	0.351					
	0.626	0.461					
0.166	0.706	0.54	0.481	36			
	0.628	0.462					
	0.608	0.442					
0.166	0.908	0.742	0.627	57	FgApks12		
	0.747	0.581					
	0.724	0.558					
0.175	0.881	0.705	0.589	52		FgApks12	
	0.718	0.542					
	0.694	0.518					
0.175	1.002	0.826	0.690	65			FgApks12
	0.814	0.638					
	0.782	0.606					
0.166	0.706	0.54	0.481	38			
	0.628	0.462					
	0.608	0.442					
0.175	0.221	0.045	0.065	6	FgApks12		
	0.229	0.053					
	0.272	0.096					
0.165	0.242	0.077	0.090	10		FgApks12	
	0.242	0.077					
	0.28	0.115					
0.175	0.306	0.130	0.102	10			FgApks12
	0.275	0.099					
	0.253	0.077					

ANHANG

Absorption (405 nm)						
Mittelwert Negativkontrolle	Wert Probe	Korrigierter Wert	Mittelwert korrigiert	Normalisiert auf Eichgerade in %		
0.175	0.232 0.227 0.269	0.056 0.051 0.093	0.067	7		
0.166	0.274 0.299 0.405	0.108 0.133 0.239	0.160	12	Fg Δ hex-1	
0.166	0.271 0.241 0.228	0.105 0.075 0.062	0.081	8		
0.166	0.389 0.385 0.347	0.223 0.219 0.181	0.208	15		
0.166	0.237 0.239 0.269	0.071 0.073 0.103	0.082	8		
0.167	0.7 0.745 0.96	0.532 0.577 0.792	0.634	63		
0.165	0.932 0.782 0.74	0.767 0.617 0.575	0.653	67		
0.165	0.956 0.789 0.958	0.791 0.624 0.793	0.733	76		
0.165	0.636 0.615 0.611	0.471 0.450 0.446	0.456	47		
0.167	0.839 0.833 0.877	0.671 0.665 0.709	0.682	67		
0.165	0.626 0.600 0.580	0.461 0.435 0.415	0.437	47		
0.167	0.866 0.724 0.672	0.698 0.556 0.504	0.587	58		
0.165	0.956 0.799 0.958	0.791 0.634 0.793	0.739	76		
0.166	0.871 0.863 0.851	0.705 0.697 0.685	0.694	73		Fg Δ hex-1
0.175	0.963 0.783 0.708	0.787 0.607 0.532	0.642	64		
0.165	0.939 0.938 1.308	0.774 0.773 1.143	0.900	89		
0.165	1.218 1.036 1.008	1.053 0.871 0.843	0.922	90		
0.165	0.334	0.169	0.206	18		

ANHANG

Absorption (405 nm)					
Mittelwert Negativkontrolle	Wert Probe	Korrigierter Wert	Mittelwert korrigiert	Normalisiert auf Eichgerade in %	
	0.359 0.419	0.194 0.254			
0.165	0.264 0.227 0.224	0.099 0.062 0.059	0.073	7	
0.166	0.222 0.222 0.234	0.056 0.056 0.068	0.06	6	
0.165	0.22 0.231 0.245	0.055 0.066 0.08	0.06	6	
0.166	0.406 0.360 0.350	0.230 0.194 0.184	0.203	17	
0.167	0.43 0.467 0.562	0.262 0.299 0.394	0.319	28	
0.165	0.495 0.516 0.626	0.330 0.351 0.461	0.381	35	
0.167	0.351 0.381 0.48	0.183 0.213 0.312	0.237	22	
0.167	0.125 0.136 0.129	0.262 0.299 0.394	0.319	32	Fgso↓ ^{0.4}
0.165	0.625 0.598 0.580	0.460 0.432 0.415	0.433	47	
0.165	0.577 0.490 0.589	0.412 0.325 0.424	0.387	35	
0.167	0.667 0.535 0.516	0.499 0.367 0.348	0.405	42	
0.167	0.269 0.256 0.270	0.102 0.089 0.103	0.098	11	
0.165	0.264 0.227 0.224	0.099 0.062 0.059	0.073	7	
0.165	0.227 0.246 0.256	0.062 0.081 0.091	0.078	8	
0.165	0.276 0.407 0.413	0.111 0.242 0.248	0.240	19	
0.165	1.024 1.061 1.167	0.859 0.896 1.002	0.919	90	
0.166	0.908 1.018	0.742 0.852	0.784	77	

ANHANG

Absorption (405 nm)					
Mittelwert Negativkontrolle	Wert Probe	Korrigierter Wert	Mittelwert korrigiert	Normalisiert auf Eichgerade in %	
	0.924	0.758			
0.166	0.907 0.820 0.817	0.741 0.654 0.651	0.682	68	
0.165	0.857 0.938 1.214	0.692 0.773 1.049	0.838	82	
0.167	0.239 0.233 0.277	0.071 0.065 0.109	0.082	8	Fgso↑ ^{2.3}
0.166	0.253 0.280 0.238	0.087 0.114 0.072	0.091	10	
0.166	0.228 0.198 0.216	0.062 0.032 0.050	0.048	4	
0.167	0.262 0.221 0.234	0.095 0.054 0.067	0.072	7	
0.165	0.467 0.375 0.322	0.302 0.210 0.157	0.223	24	
0.165	0.577 0.477 0.467	0.412 0.312 0.302	0.342	36	
0.166	0.355 0.424 0.325	0.189 0.258 0.159	0.202	19	
0.166	0.411 0.431 0.397	0.245 0.265 0.231	0.247	25	
0.166	0.814 0.710 0.750	0.648 0.544 0.584	0.604	60	
0.165	0.985 1.006 1.072	0.793 0.841 0.907	0.847	85	
0.167	0.665 0.756 0.691	0.498 0.589 0.524	0.537	51	
0.167	0.958 0.889 1.018	0.791 0.722 0.851	0.788	76	

Anhang 3C: ELISA Rohdaten Test virusinfizierte Konidien Wildtyp

1 Infektion FgPH1 (25%)										
A (405 nm)					A (405 nm)					
Ø NK	Probe	Korr. Wert	Ø Korr. Wert	VI/VF	Ø NK	Probe	Korr. Wert	Ø Korr. Wert	VI/VF	
0.165	0.164	-0.001	0.016		0.165	0.389	0.224	0.224	VI	

ANHANG

	0.198	0.033				0.379	0.214		
	0.181	0.016				0.399	0.234		
	0.177	0.012				0.391	0.226		VI
	0.178	0.013	0.007			0.417	0.252	0.236	
	0.161	-0.004				0.395	0.230		
	0.732	0.567		VI		0.174	0.009		
	0.775	0.610	0.586			0.173	0.008	0.010	
	0.746	0.581				0.180	0.015		
	0.720	0.555		VI		0.171	0.006		
	0.771	0.606	0.587			0.168	0.003	-0.022	
	0.764	0.599				0.092	-0.073		
	0.159	-0.006				0.159	-0.006		
	0.174	0.009	0.010			0.166	0.001	-0.003	
	0.190	0.025				0.161	-0.004		
	0.155	-0.010				0.170	0.005		
	0.186	0.021	0.008			0.160	-0.005	0.001	
	0.178	0.013				0.168	0.003		
	0.451	0.286		VI		0.167	0.002		
	0.472	0.307	0.292			0.162	-0.003	-0.001	
	0.448	0.283				0.163	-0.002		
	0.514	0.349		VI		0.159	-0.006		
	0.527	0.362	0.420			0.168	0.003	0.000	
	0.714	0.549				0.169	0.004		
	0.170	0.005				0.184	0.019		
	0.166	0.001	0.003			0.176	0.011	0.033	
	0.168	0.003				0.234	0.069		
	0.182	0.017				0.183	0.018		
	0.167	0.002	0.011			0.180	0.015	0.010	
	0.179	0.014				0.163	-0.002		
	0.203	0.038				0.620	0.455		VI
	0.202	0.037	0.038			0.640	0.475	0.465	
	0.204	0.039				0.628	0.463		
	0.207	0.042				0.557	0.392		VI
	0.201	0.036	0.041			0.589	0.424	0.410	
	0.210	0.045				0.577	0.412		
	0.203	0.038				0.173	0.008		
	0.207	0.042	0.044			0.176	0.011	0.016	
	0.215	0.050				0.194	0.029		
	0.229	0.064				0.197	0.032		
	0.218	0.053	0.062			0.212	0.047	0.029	
	0.232	0.067				0.174	0.009		
	0.230	0.065				0.176	0.011		
	0.218	0.053	0.058			0.181	0.016	0.012	
	0.220	0.055				0.175	0.010		
	0.233	0.068				0.163	-0.002		
	0.231	0.066	0.076			0.163	-0.002	-0.003	
	0.258	0.093				0.161	-0.004		
	0.196	0.031				0.167	0.002		
	0.189	0.024	0.027			0.185	0.020	0.014	
	0.189	0.024				0.184	0.019		
	0.221	0.056				0.168	0.003		
	0.238	0.073	0.070			0.172	0.007	0.004	
	0.245	0.080				0.167	0.002		
	0.529	0.364		VI		0.182	0.017		
	0.559	0.394	0.369			0.192	0.027	0.017	
	0.514	0.349				0.173	0.008		
	0.535	0.370		VI		0.170	0.005		
	0.536	0.371	0.377			0.156	-0.009	0.000	
	0.556	0.391				0.168	0.003		

2 Infektion FgPH1 (20%)

A (405 nm)					A (405 nm)				
Ø NK	Probe	Korr. Wert	Ø Korr. Wert	VI/VF	Ø NK	Probe	Korr. Wert	Ø Korr. Wert	VI/VF
0.165	0.154	-0.011	-0.005	VF	0.165	0.722	0.557	0.592	VI

ANHANG

	0.167	0.002				0.744	0.579		
	0.159	-0.006				0.806	0.641		
	0.166	0.001				0.168	0.003	0.024	
	0.165	0.000	0.000			0.190	0.025		
	0.165	0.000				0.208	0.043		
	0.935	0.770		VI		0.184	0.019	0.022	
	0.829	0.664	0.688			0.202	0.037		
	0.794	0.629				0.174	0.009		
	0.164	-0.001				0.162	-0.003	0.000	
	0.177	0.012	0.002			0.168	0.003		
	0.160	-0.005				0.165	0.000		
	0.184	0.019				0.168	0.003	0.006	
	0.176	0.011	0.011			0.165	0.000		
	0.168	0.003				0.180	0.015		
	0.160	-0.005				0.162	-0.003		
	0.171	0.006	0.000			0.176	0.011	-0.001	
	0.163	-0.002				0.155	-0.010		
	0.175	0.010				0.151	-0.014		
	0.167	0.002	0.006			0.160	-0.005	0.001	
	0.170	0.005				0.186	0.021		
	0.188	0.023				0.171	0.006		
	0.175	0.010	0.041			0.154	-0.011	0.005	
	0.256	0.091				0.184	0.019		
	0.707	0.542		VI		0.153	-0.012		
	0.715	0.550	0.559			0.161	-0.004	-0.006	
	0.750	0.585				0.163	-0.002		
	0.206	0.041				0.184	0.019		
	0.189	0.024	0.025			0.202	0.037	0.022	
	0.174	0.009				0.174	0.009		
	0.172	0.007				0.788	0.623		VI
	0.156	-0.009	-0.002			0.728	0.563	0.577	
	0.163	-0.002				0.711	0.546		
	0.155	-0.010				0.167	0.002		
	0.171	0.006	0.002			0.185	0.020	0.014	
	0.176	0.011				0.184	0.019		
	0.176	0.011				0.168	0.003		
	0.174	0.009	0.020			0.172	0.007	0.004	
	0.206	0.041				0.167	0.002		
	0.387	0.222		VI		0.159	-0.006		
	0.399	0.234	0.245			0.174	0.009	0.005	
	0.444	0.279				0.177	0.012		
	0.175	0.010				0.159	-0.006		
	0.175	0.010	0.011			0.156	-0.009	-0.003	
	0.179	0.014				0.171	0.006		
	0.163	-0.002				0.729	0.564		VI
	0.167	0.002	-0.001			0.702	0.537	0.534	
	0.164	-0.001				0.666	0.501		
	0.185	0.020				0.698	0.533		VI
	0.196	0.031	0.022			0.669	0.504	0.496	
	0.181	0.016				0.617	0.452		
	0.180	0.015				0.173	0.008		
	0.172	0.007	0.011			0.176	0.011	0.009	
	0.178	0.013				0.175	0.010		
	0.161	-0.004				0.167	0.002		
	0.178	0.013	0.004			0.177	0.012	0.012	
	0.166	0.001				0.188	0.023		
	0.526	0.361		VI		0.175	0.010		
	0.527	0.362	0.373			0.195	0.030	0.014	
	0.560	0.395				0.168	0.003		

3 Infektion FgPH1 (35%)

A (405 nm)					A (405 nm)				
Ø NK	Probe	Korr. Wert	Ø Korr. Wert	VI/VF	Ø NK	Probe	Korr. Wert	Ø Korr. Wert	VI/VF

ANHANG

0.165	0.189	0.024	0.027		0.165	0.810	0.645	0.551	VI
	0.203	0.038				0.710	0.545		
	0.186	0.021				0.629	0.464		
	0.986	0.821	0.846	VI		0.683	0.518	0.537	VI
	1.014	0.849				0.684	0.519		
	1.034	0.869				0.740	0.575		
	0.188	0.023	0.021			0.170	0.005	0.001	
	0.183	0.018				0.169	0.004		
	0.189	0.024				0.160	-0.005		
	0.181	0.016	0.014			0.179	0.014	0.016	
	0.175	0.010				0.164	-0.001		
	0.183	0.018				0.199	0.034		
	0.840	0.675	0.598	VI		0.196	0.031	0.047	
	0.718	0.553				0.224	0.059		
	0.731	0.566				0.216	0.051		
	0.743	0.578	0.580	VI		0.189	0.024	0.029	
	0.744	0.579				0.198	0.033		
	0.750	0.585				0.194	0.029		
	0.161	-0.004	-0.007			0.193	0.028	0.012	
	0.160	-0.005				0.178	0.013		
	0.155	-0.010				0.160	-0.005		
	0.160	-0.005	0.023			0.198	0.033	0.044	
	0.196	0.031				0.216	0.051		
	0.209	0.044				0.211	0.046		
	0.166	0.001	0.007			0.971	0.806	0.778	VI
	0.172	0.007				0.930	0.765		
	0.179	0.014				0.928	0.763		
	0.173	0.008	0.013			0.215	0.050	0.053	
	0.175	0.010				0.226	0.061		
	0.186	0.021				0.213	0.048		
	0.168	0.003	0.012			0.193	0.028	0.033	
	0.187	0.022				0.207	0.042		
	0.178	0.013				0.194	0.029		
	0.829	0.664	0.621	VI		0.175	0.010	0.015	
	0.793	0.628				0.178	0.013		
	0.737	0.572				0.185	0.020		
	0.179	0.014	0.012			1.060	0.895	0.730	VI
	0.163	-0.002				0.881	0.716		
	0.189	0.024				0.744	0.579		
	0.165	0.000	0.009			0.937	0.772	0.809	VI
	0.178	0.013				0.937	0.772		
	0.180	0.015				1.047	0.882		
	0.147	-0.018	-0.003			0.102	-0.063	-0.050	
	0.160	-0.005				0.138	-0.027		
	0.180	0.015				0.105	-0.060		
	0.851	0.686	0.734	VI		0.113	-0.052	-0.044	
0.884	0.719			0.113	-0.052				
0.964	0.799			0.136	-0.029				
0.171	0.006	0.009		0.249	0.084	0.046			
0.170	0.005			0.182	0.017				
0.183	0.018			0.202	0.037				
0.178	0.013	0.011		0.225	0.060	0.069			
0.180	0.015			0.231	0.066				
0.172	0.007			0.245	0.080				
1.016	0.851	0.823	VI	0.587	0.422	0.343	VI		
1.003	0.838			0.493	0.328				
0.947	0.782			0.445	0.280				
1.049	0.884	0.902	VI	0.514	0.349	0.375	VI		
1.034	0.869			0.525	0.360				
1.118	0.953			0.581	0.416				

ANHANG

Anhang 3D: ELISA Rohdaten Test virusinfizierte Konidien FgΔpks12

FgΔpks12 hohe Viruskonzentration									
A (405 nm)				A (405 nm)					
Ø NK	Probe	Korr. Wert	Ø Korr. Wert	VI/VF	Ø NK	Probe	Korr. Wert	Ø Korr. Wert	VI/VF
0.201	0.195	-0.006	-0.013		0.201	0.415	0.214	0.183	VI
	0.177	-0.024				0.365	0.164		
	0.191	-0.010				0.372	0.171		
	0.26	0.059	0.019			0.232	0.031	0.028	
	0.201	0.000				0.225	0.024		
	0.199	-0.002				0.23	0.029		
	0.186	-0.015	-0.017			0.234	0.033	0.039	
	0.188	-0.013				0.238	0.037		
	0.179	-0.022				0.249	0.048		
	0.22	0.019	0.013			0.196	-0.005	-0.006	
	0.213	0.012				0.197	-0.004		
	0.21	0.009				0.193	-0.008		
	0.215	0.014	0.016			0.191	-0.010	0.000	
	0.212	0.011				0.209	0.008		
	0.225	0.024				0.202	0.001		
0.109	0.221	0.112	0.101	VI		0.181	0.072	0.048	
	0.214	0.105				0.145	0.036		
	0.196	0.087				0.144	0.035		
	0.198	0.089	0.113	VI		0.117	0.008	0.018	
	0.225	0.116				0.129	0.020		
	0.244	0.135				0.135	0.026		
	0.116	0.007	0.005			0.107	-0.002	0.003	
	0.114	0.005				0.111	0.002		
	0.112	0.003				0.118	0.009		
	0.177	0.068	0.065			0.125	0.016	0.006	
	0.176	0.067				0.112	0.003		
	0.168	0.059				0.108	-0.001		
	0.1	-0.009	-0.007			0.127	0.018	0.018	
	0.099	-0.010				0.116	0.007		
	0.108	-0.001				0.138	0.029		
0.122	0.106	-0.016	-0.012			0.105	-0.017	-0.004	
	0.118	-0.004				0.103	-0.019		
	0.107	-0.015				0.146	0.024		
	0.111	-0.011	-0.019			0.113	-0.009	-0.014	
	0.102	-0.020				0.113	-0.009		
	0.096	-0.026				0.097	-0.025		
	0.179	0.057	0.058			0.107	-0.015	-0.016	
	0.201	0.079				0.103	-0.019		
	0.161	0.039				0.107	-0.015		
	0.147	0.025	0.016			0.116	-0.006	-0.008	
	0.143	0.021				0.113	-0.009		
	0.125	0.003				0.112	-0.010		
	0.203	0.081	0.063			0.202	0.080	0.090	VI
	0.184	0.062				0.227	0.105		
	0.169	0.047				0.207	0.085		
0.122	0.112	-0.010	0.004			0.119	-0.003	0.015	
	0.177	0.055				0.149	0.027		
	0.088	-0.034				0.144	0.022		
	0.095	-0.027	-0.024			0.148	0.026	0.016	
	0.099	-0.023				0.128	0.006		
	0.099	-0.023				0.137	0.015		
	0.094	-0.028	-0.025			0.125	0.003	-0.007	
	0.09	-0.032				0.112	-0.010		
	0.108	-0.014				0.108	-0.014		
	0.107	-0.015	-0.010			0.11	-0.012	-0.008	
	0.111	-0.011				0.124	0.002		
	0.118	-0.004				0.107	-0.015		
	0.186	0.064	0.068			0.262	0.140	0.128	VI
	0.186	0.064				0.248	0.126		

ANHANG

	0.197	0.075				0.239	0.117		
0.103	0.262	0.159	0.061			0.826	0.723	0.660	VI
	0.119	0.016				0.761	0.658		
	0.110	0.007				0.702	0.599		
	0.109	0.006	0.003			0.099	-0.004	-0.007	
	0.115	0.012				0.096	-0.007		
	0.094	-0.009				0.093	-0.010		
	0.113	0.010	0.007			0.188	0.085	0.098	VI
	0.109	0.006				0.224	0.121		
	0.109	0.006				0.191	0.088		
	0.133	0.030	0.022			0.096	-0.007	-0.003	
	0.130	0.027				0.099	-0.004		
	0.111	0.008				0.106	0.003		
	0.105	0.002	0.015			0.113	0.010	0.005	
	0.103	0.000				0.113	0.010		
	0.146	0.043				0.097	-0.006		
0.251	0.218	-0.033	-0.025			0.241	-0.010	-0.002	
	0.238	-0.013				0.267	0.016		
	0.223	-0.028				0.238	-0.013		
	0.228	-0.023	-0.019			0.273	0.022	0.032	
	0.235	-0.016				0.294	0.043		
	0.234	-0.017				0.282	0.031		
	0.26	0.009	0.032			0.714	0.463	0.448	VI
	0.305	0.054				0.718	0.467		
	0.283	0.032				0.664	0.413		
	0.304	0.053	0.013			0.27	0.019	0.005	
	0.254	0.003				0.249	-0.002		
	0.234	-0.017				0.25	-0.001		
	0.272	0.021	0.009			0.268	0.017	0.013	
	0.245	-0.006				0.267	0.016		
	0.264	0.013				0.257	0.006		
FgΔpks12 niedrige Viruskonzentration									
A (405 nm)						A (405 nm)			
Ø NK	Probe	Korr. Wert	Ø Korr. Wert	VI/VF	Ø NK	Probe	Korr. Wert	Ø Korr. Wert	VI/VF
0.222	0.26	0.038	0.061			0.27	0.048	0.034	
	0.305	0.083				0.249	0.027		
	0.283	0.061				0.25	0.028		
	0.304	0.082	0.042			0.43	0.208	0.170	VI
	0.254	0.032				0.334	0.112		
	0.234	0.012				0.413	0.191		
	0.241	0.019	0.027			0.223	0.001	0.010	
	0.267	0.045				0.226	0.004		
	0.238	0.016				0.247	0.025		
	0.273	0.051	0.061			0.218	-0.004	0.004	
	0.294	0.072				0.238	0.016		
	0.282	0.060				0.223	0.001		
	0.614	0.392	0.343	VI		0.228	0.006	0.010	
	0.518	0.296				0.235	0.013		
	0.564	0.342				0.234	0.012		
0.203	0.382	0.179	0.165	VI		0.255	0.052	0.050	
	0.37	0.167				0.258	0.055		
	0.353	0.150				0.246	0.043		
	0.826	0.623	0.659	VI		0.216	0.013	0.017	
	0.921	0.718				0.213	0.010		
	0.838	0.635				0.231	0.028		
	0.351	0.148	0.101	VI		0.203	0.000	0.004	
	0.281	0.078				0.226	0.023		
	0.279	0.076				0.191	-0.012		
	0.235	0.032	0.036			0.206	0.003	0.008	
	0.234	0.031				0.206	0.003		
	0.248	0.045				0.22	0.017		
	0.195	-0.008	-0.001			0.205	0.002	0.004	
	0.201	-0.002				0.215	0.012		

ANHANG

	0.211	0.008				0.2	-0.003		
0.251	0.278	0.027	0.046			0.254	0.003	-0.002	
	0.272	0.021				0.244	-0.007		
	0.342	0.091				0.25	-0.001		
	0.407	0.156	0.183	VI		0.242	-0.009	-0.001	
	0.427	0.176				0.247	-0.004		
	0.468	0.217				0.261	0.010		
	0.295	0.044	0.014			0.251	0.000	-0.016	
	0.262	0.011				0.228	-0.023		
	0.239	-0.012				0.225	-0.026		
	0.249	-0.002	0.015			0.219	-0.032	-0.023	
	0.278	0.027				0.238	-0.013		
	0.272	0.021				0.228	-0.023		
	0.292	0.041	0.029			0.208	-0.043	-0.026	
	0.272	0.021				0.226	-0.025		
	0.277	0.026				0.242	-0.009		
0.202	0.242	0.040	0.032			0.227	0.025	0.009	
	0.247	0.045				0.218	0.016		
	0.212	0.010				0.189	-0.013		
	0.226	0.024	0.028			0.204	0.002	0.010	
	0.219	0.017				0.216	0.014		
	0.246	0.044				0.217	0.015		
	0.206	0.004	0.004			0.777	0.575	0.668	VI
	0.217	0.015				0.885	0.683		
	0.194	-0.008				0.949	0.747		
	0.189	-0.013	-0.011			0.711	0.509	0.523	VI
	0.19	-0.012				0.754	0.552		
	0.194	-0.008				0.71	0.508		
	1.006	0.804	0.707	VI		0.215	0.013	0.015	
	0.903	0.701				0.212	0.010		
	0.817	0.615				0.225	0.023		
0.189	0.194	0.005	0.001			0.225	0.036	0.020	
	0.191	0.002				0.198	0.009		
	0.184	-0.005				0.203	0.014		
	0.201	0.012	0.003			0.204	0.015	0.008	
	0.191	0.002				0.204	0.015		
	0.184	-0.005				0.182	-0.007		
	0.534	0.345	0.383	VI		0.19	0.001	0.007	
	0.559	0.370				0.2	0.011		
	0.623	0.434				0.199	0.010		
	0.254	0.065	0.050			0.251	0.062	0.028	
	0.236	0.047				0.201	0.012		
	0.226	0.037				0.2	0.011		
	0.203	0.014	0.008			0.199	0.010	0.015	
	0.194	0.005				0.204	0.015		
	0.193	0.004				0.209	0.020		
0.155	0.196	0.041	0.040			0.9	0.745	0.581	VI
	0.197	0.042				0.802	0.647		
	0.193	0.038				0.505	0.350		
	0.191	0.036	0.046			0.186	0.031	0.029	
	0.209	0.054				0.188	0.033		
	0.202	0.047				0.179	0.024		
	1.714	1.559	1.501	VI		0.703	0.548	0.484	VI
	1.542	1.387				0.572	0.417		
	1.713	1.558				0.642	0.487		
	0.232	0.077	0.074			0.189	0.034	0.027	
	0.225	0.070				0.189	0.034		
	0.23	0.075				0.168	0.013		
	0.234	0.079	0.052			0.172	0.017	0.011	
	0.238	0.083				0.169	0.014		
	0.149	-0.006				0.158	0.003		

ANHANG

Anhang 3E: ELISA Rohdaten Test virusinfizierte Konidien FgΔhex-1

FgΔhex-1 hohe Viruskonzentration									
A (405 nm)			A (405 nm)						
Ø NK	Probe	Korr. Wert	Ø Korr. Wert	VI/VF	Ø NK	Probe	Korr. Wert	Ø Korr. Wert	VI/VF
0.121	0.123	0.002	-0.002			0.144	0.023	0.045	
	0.102	-0.019				0.165	0.044		
	0.131	0.010				0.188	0.067		
	0.111	-0.010	0.007			0.195	0.074	0.070	
	0.129	0.008				0.185	0.064		
	0.144	0.023				0.193	0.072		
	0.196	0.075	0.090	VI		0.131	0.010	0.004	
	0.193	0.072				0.123	0.002		
	0.243	0.122				0.122	0.001		
	0.164	0.043	0.019			0.133	0.012	-0.002	
	0.131	0.010				0.096	-0.025		
	0.124	0.003				0.129	0.008		
	0.165	0.044	0.030			0.133	0.012	0.004	
	0.186	0.065				0.13	0.009		
	0.102	-0.019				0.111	-0.010		
0.146	0.149	0.003	-0.007			0.124	-0.022	-0.002	
	0.131	-0.015				0.151	0.005		
	0.136	-0.010				0.156	0.010		
	0.152	0.006	-0.017			0.15	0.004	-0.004	
	0.135	-0.011				0.125	-0.021		
	0.099	-0.047				0.151	0.005		
	0.374	0.228	0.232	VI		0.153	0.007	-0.004	
	0.414	0.268				0.126	-0.020		
	0.347	0.201				0.148	0.002		
	0.281	0.135	0.204	VI		0.137	-0.009	0.000	
	0.353	0.207				0.135	-0.011		
	0.415	0.269				0.167	0.021		
	0.135	-0.011	0.006			0.153	0.007	0.017	
	0.167	0.021				0.17	0.024		
	0.153	0.007				0.167	0.021		
0.134	0.14	0.006	0.001			0.164	0.030	0.018	
	0.128	-0.006				0.156	0.022		
	0.137	0.003				0.135	0.001		
	0.122	-0.012	-0.007			0.401	0.267	0.271	VI
	0.123	-0.011				0.381	0.247		
	0.137	0.003				0.434	0.300		
	0.173	0.039	0.019			0.807	0.673	0.695	VI
	0.152	0.018				0.768	0.634		
	0.133	-0.001				0.912	0.778		
	0.136	0.002	0.002			0.135	0.001	0.002	
	0.138	0.004				0.142	0.008		
	0.135	0.001				0.132	-0.002		
	0.249	0.115	0.123			0.138	0.004	0.010	
	0.263	0.129				0.147	0.013		
	0.258	0.124				0.147	0.013		
0.134	0.143	0.009	0.005			0.912	0.778	0.847	VI
	0.137	0.003				0.958	0.824		
	0.137	0.003				1.073	0.939		
	0.132	-0.002	0.003			0.158	0.024	0.015	
	0.139	0.005				0.149	0.015		
	0.14	0.006				0.139	0.005		
	0.169	0.035	0.017			0.127	-0.007	0.000	
	0.148	0.014				0.146	0.012		
	0.136	0.002				0.128	-0.006		
	1.047	0.913	0.797	VI		0.134	0.000	0.017	
	0.85	0.716				0.16	0.026		

ANHANG

	0.896	0.762				0.159	0.025				
	0.143	0.009	0.002			0.147	0.013	0.004			
	0.127	-0.007				0.143	0.009				
	0.137	0.003				0.123	-0.011				
0.143	0.253	0.110		0.098	VI		0.401		0.258	0.262	VI
	0.24	0.097				0.381	0.238				
	0.229	0.086				0.434	0.291				
	0.525	0.382	0.397	VI		0.147	0.004	-0.004			
	0.541	0.398				0.128	-0.015				
	0.554	0.411				0.141	-0.002				
	0.139	-0.004	0.001			0.242	0.099	0.107			
	0.142	-0.001				0.247	0.104				
	0.151	0.008				0.261	0.118				
	0.142	-0.001	0.005			0.144	0.001	0.004			
	0.156	0.013				0.158	0.015				
	0.145	0.002				0.14	-0.003				
	0.142	-0.001	0.005			0.144	0.001	-0.008			
	0.156	0.013				0.133	-0.010				
	0.145	0.002				0.128	-0.015				
0.143	0.249	0.106	0.114	VI		0.374	0.231	0.235	VI		
	0.263	0.120				0.414	0.271				
	0.258	0.115				0.347	0.204				
	0.135	-0.008	-0.007			0.281	0.138	0.207	VI		
	0.142	-0.001				0.353	0.210				
	0.132	-0.011				0.415	0.272				
	0.144	0.001	0.004			0.117	-0.026	-0.018			
	0.158	0.015				0.13	-0.013				
	0.14	-0.003				0.129	-0.014				
	0.144	0.001	-0.008			0.127	-0.016	-0.009			
	0.133	-0.010				0.135	-0.008				
	0.128	-0.015				0.14	-0.003				
	0.503	0.360	0.329	VI		0.135	-0.008	0.016			
	0.455	0.312				0.142	-0.001				
	0.459	0.316				0.201	0.058				
FgΔhex-1 niedrige Viruskonzentration											
A (405 nm)											
\emptyset NK	Probe	Korr. Wert	\emptyset Korr. Wert	VI/VF	\emptyset NK	Probe	Korr. Wert	\emptyset Korr. Wert	VI/VF		
0.140	0.134	-0.006	0.000			0.511	0.371	0.388	VI		
	0.139	-0.001					0.541		0.401		
	0.148	0.008					0.533		0.393		
	0.739	0.599	0.593	VI		0.503	0.363	0.332	VI		
	0.714	0.574					0.455		0.315		
	0.746	0.606					0.459		0.319		
	0.14	0.000	0.004			0.138	-0.002	-0.009			
	0.14	0.000					0.128		-0.012		
	0.151	0.011					0.126		-0.014		
	0.124	-0.016	-0.013			0.152	0.012	0.007			
	0.131	-0.009					0.132		-0.008		
	0.127	-0.013					0.157		0.017		
	0.312	0.172	0.151			0.12	-0.020	-0.016			
	0.281	0.141					0.119		-0.021		
	0.281	0.141					0.133		-0.007		
0.143	0.139	-0.004	0.001			0.164	0.021	0.009			
	0.142	-0.001					0.156		0.013		
	0.151	0.008					0.135		-0.008		
	0.142	-0.001	0.005			0.525	0.382	0.397	VI		
	0.156	0.013					0.541		0.398		
	0.145	0.002					0.554		0.411		
	0.249	0.106	0.114	VI		0.477	0.334	0.326	VI		
	0.263	0.120					0.458		0.315		

ANHANG

	0.258	0.115				0.472	0.329		
	0.135	-0.008	-0.007			0.129	-0.014	0.000	
	0.142	-0.001				0.147	0.004		
	0.132	-0.011				0.154	0.011		
	0.401	0.258	0.262	VI		0.729	0.586	0.583	VI
	0.381	0.238				0.719	0.576		
	0.434	0.291							
0.134	0.143	0.009	0.005			0.274	0.140	0.123	VI
	0.137	0.003				0.25	0.116		
	0.137	0.003				0.247	0.113		
	0.132	-0.002	0.003			0.127	-0.007	-0.004	
	0.139	0.005				0.135	0.001		
	0.14	0.006				0.128	-0.006		
	0.134	0.000	0.017			0.151	0.017	0.009	
	0.16	0.026				0.14	0.006		
	0.159	0.025				0.138	0.004		
	0.147	0.013	0.004			0.126	-0.008	-0.005	
	0.143	0.009				0.132	-0.002		
	0.123	-0.011				0.129	-0.005		
	0.143	0.009	0.001			0.457	0.323	0.327	VI
	0.129	-0.005				0.446	0.312		
	0.133	-0.001				0.479	0.345		
0.129	0.143	0.014	0.006			0.239	0.110	0.136	VI
	0.129	0.000				0.297	0.168		
	0.133	0.004				0.26	0.131		
	0.127	-0.002	-0.002			0.142	0.013	0.012	
	0.122	-0.007				0.148	0.019		
	0.131	0.002				0.133	0.004		
	0.592	0.463	0.467	VI		0.443	0.314	0.332	VI
	0.625	0.496				0.455	0.326		
	0.572	0.443				0.485	0.356		
	0.464	0.335	0.330	VI		0.278	0.149	0.134	VI
	0.456	0.327				0.254	0.125		
	0.457	0.328				0.257	0.128		
	0.774	0.645	0.601	VI		0.139	0.010	0.025	
	0.724	0.595				0.177	0.048		
	0.693	0.564				0.145	0.016		
0.131	0.472	0.341	0.231	VI		0.137	0.006	0.061	
	0.293	0.162				0.214	0.083		
	0.321	0.190				0.224	0.093		
	0.313	0.182	0.188	VI		0.2	0.069	0.055	
	0.322	0.191				0.177	0.046		
	0.323	0.192				0.181	0.050		
	0.24	0.109	0.063			0.184	0.053	0.055	
	0.23	0.099				0.184	0.053		
	0.112	-0.019				0.189	0.058		
	0.332	0.201	0.187	VI		0.364	0.233	0.242	VI
	0.319	0.188				0.314	0.183		
	0.302	0.171				0.44	0.309		
	0.182	0.051	0.060			0.301	0.170	0.151	VI
	0.193	0.062				0.269	0.138		
	0.197	0.066				0.276	0.145		
0.136	0.5	0.364	0.333	VI		0.468	0.337	0.220	VI
	0.459	0.323				0.306	0.175		
	0.448	0.312				0.28	0.149		
	0.533	0.397	0.378	VI		0.335	0.204	0.226	VI
	0.513	0.377				0.36	0.229		
	0.496	0.360				0.377	0.246		
	0.32	0.184	0.187	VI		0.17	0.039	0.021	
	0.328	0.192				0.146	0.015		
	0.322	0.186				0.139	0.008		

ANHANG

	0.136	0.000	0.006			0.137	0.006	0.004	
	0.14	0.004				0.137	0.006		
	0.15	0.014				0.13	-0.001		
	0.141	0.005	0.003			0.146	0.015	0.009	
	0.119	-0.017				0.131	0.000		
	0.156	0.020				0.142	0.011		

Anhang 3F: ELISA Rohdaten Test virusinfizierte Konidien Fg_{oe}hex-1

Fg _{oe} hex-1 hohe Viruskonzentration										
A (405 nm)						A (405 nm)				
Ø NK	Probe	Korr. Wert	Ø Korr. Wert	VI/VF	Ø NK	Probe	Korr. Wert	Ø Korr. Wert	VI/VF	
0.136	0.468	0.332	0.215	VI		0.17	0.065	0.047		
	0.306	0.170					0.146		0.041	
	0.28	0.144					0.139		0.034	
	0.126	-0.010	0.000			0.137	0.032	0.030		
	0.134	-0.002					0.137		0.032	
	0.148	0.012					0.13		0.025	
	0.146	0.010	0.004			0.136	0.031	0.037		
	0.131	-0.005					0.14		0.035	
	0.142	0.006					0.15		0.045	
	0.144	0.008	-0.002			0.141	0.036	0.034		
	0.126	-0.010					0.119		0.014	
	0.133	-0.003					0.156		0.051	
	0.13	-0.006	-0.004			0.335	0.230	0.252	VI	
	0.133	-0.003					0.36		0.255	
	0.134	-0.002					0.377		0.272	
0.105	0.108	0.003	0.010			0.155	0.050	0.020		
	0.122	0.017					0.101		-0.004	
	0.114	0.009					0.119		0.014	
	0.215	0.110	0.082	VI		0.124	0.019	0.012		
	0.173	0.068					0.113		0.008	
	0.174	0.069					0.115		0.010	
	0.145	0.040	0.019			0.099	-0.006	-0.003		
	0.109	0.004					0.099		-0.006	
	0.118	0.013					0.109		0.004	
	0.105	0.000	0.001			0.115	0.010	-0.004		
	0.108	0.003					0.106		0.001	
	0.105	0.000					0.081		-0.024	
	0.093	-0.012	-0.010			0.104	-0.001	-0.010		
	0.105	0.000					0.097		-0.008	
	0.087	-0.018					0.083		-0.022	
0.112	0.106	-0.006	-0.002			0.107	-0.005	-0.006		
	0.118	0.006					0.103		-0.009	
	0.107	-0.005					0.107		-0.005	
	0.111	-0.001	-0.009			0.116	0.004	0.002		
	0.102	-0.010					0.113		0.001	
	0.096	-0.016					0.112		0.000	
	0.105	-0.007	0.006			0.125	0.013	0.003		
	0.103	-0.009					0.112		0.000	
	0.146	0.034					0.108		-0.004	
	0.113	0.001	-0.004			0.11	-0.002	0.002		
	0.113	0.001					0.124		0.012	
	0.097	-0.015					0.107		-0.005	
	0.179	0.067	0.068			0.147	0.035	0.026		
	0.201	0.089					0.143		0.031	
	0.161	0.049					0.125		0.013	
0.098	0.094	-0.004	-0.002			0.218	0.120	0.101	VI	
	0.099	0.001					0.183		0.085	
	0.094	-0.004					0.195		0.097	
	0.1	0.002	0.004			0.099	0.001	-0.004		

ANHANG

	0.099	0.001				0.094	-0.004		
	0.108	0.010				0.09	-0.008		
	0.088	-0.010	-0.004			0.221	0.123	0.112	VI
	0.095	-0.003				0.214	0.116		
	0.099	0.001				0.196	0.098		
	0.099	0.001	-0.004			0.198	0.100	0.124	VI
	0.094	-0.004				0.225	0.127		
	0.09	-0.008				0.244	0.146		
	0.172	0.074	0.068			0.088	-0.010	-0.004	
	0.169	0.071				0.095	-0.003		
	0.158	0.060				0.099	0.001		
0.230	0.3	0.070	0.084			0.255	0.025	0.023	
	0.325	0.095				0.258	0.028		
	0.317	0.087				0.246	0.016		
	0.23	0.000	0.012			0.216	-0.014	-0.010	
	0.239	0.009				0.213	-0.017		
	0.257	0.027				0.231	0.001		
	0.227	-0.003	-0.007			0.203	-0.027	-0.023	
	0.229	-0.001				0.226	-0.004		
	0.214	-0.016				0.191	-0.039		
	0.266	0.036	0.039			0.206	-0.024	-0.019	
	0.256	0.026				0.206	-0.024		
	0.284	0.054				0.22	-0.010		
	0.205	-0.025	-0.023			0.309	0.079	0.097	VI
	0.215	-0.015				0.329	0.099		
	0.2	-0.030				0.343	0.113		
0.254	0.295	0.041	0.011			0.22	-0.034	-0.043	
	0.262	0.008				0.195	-0.059		
	0.239	-0.015				0.219	-0.035		
	0.249	-0.005	0.012			0.294	0.040	0.049	
	0.278	0.024				0.297	0.043		
	0.272	0.018				0.317	0.063		
	0.309	0.055	0.056			0.218	-0.036	-0.027	
	0.315	0.061				0.216	-0.038		
	0.307	0.053				0.246	-0.008		
	0.239	-0.015	-0.028			0.225	-0.029	-0.024	
	0.213	-0.041				0.231	-0.023		
	0.227	-0.027				0.234	-0.020		
	0.229	-0.025	-0.008			0.249	-0.005	0.012	
	0.247	-0.007				0.278	0.024		
	0.261	0.007				0.272	0.018		
Fg _{OEhex-1} niedrige Viruskonzentration									
A (405 nm)									
Ø NK	Probe	Korr. Wert	Ø Korr. Wert	VI/VF	Ø NK	Probe	Korr. Wert	Ø Korr. Wert	VI/VF
0.260	0.264	0.004	-0.011			0.275	0.015	-0.003	
	0.233	-0.027				0.247	-0.013		
	0.25	-0.010				0.249	-0.011		
	0.272	0.012	0.000			0.268	0.008	0.004	
	0.245	-0.015				0.267	0.007		
	0.264	0.004				0.257	-0.003		
	0.382	0.122	0.120	VI		0.346	0.086	0.066	
	0.371	0.111				0.313	0.053		
	0.386	0.126				0.319	0.059		
	0.253	-0.007	-0.039			0.276	0.016	0.023	
	0.204	-0.056				0.288	0.028		
	0.205	-0.055				0.286	0.026		
	0.213	-0.047	-0.040			0.228	-0.032	-0.007	
	0.222	-0.038				0.277	0.017		
	0.225	-0.035				0.253	-0.007		
0.245	0.38	0.135	0.089	VI		0.33	0.085	0.081	

ANHANG

	0.293	0.048				0.334	0.089		
	0.328	0.083				0.313	0.068		
	0.306	0.061	0.065			0.223	-0.022	-0.013	
	0.309	0.064				0.226	-0.019		
	0.316	0.071				0.247	0.002		
	0.38	0.135	0.103	VI		0.26	0.015	0.038	
	0.373	0.128				0.305	0.060		
	0.291	0.046				0.283	0.038		
	0.218	-0.027	-0.019			0.304	0.059	0.019	
	0.238	-0.007				0.254	0.009		
	0.223	-0.022				0.234	-0.011		
	0.228	-0.017	-0.013			0.258	0.013	0.009	
	0.235	-0.010				0.252	0.007		
	0.234	-0.011				0.253	0.008		
0.098	0.311	0.213	0.201	VI		0.749	0.651	0.630	VI
	0.293	0.195				0.712	0.614		
	0.294	0.196				0.724	0.626		
	0.906	0.808	0.807	VI		0.073	-0.025	-0.024	
	0.877	0.779				0.069	-0.029		
	0.933	0.835				0.08	-0.018		
	0.065	-0.033	-0.025			0.067	-0.031	-0.031	
	0.061	-0.037				0.072	-0.026		
	0.092	-0.006				0.061	-0.037		
	0.067	-0.031	-0.032			0.061	-0.037	-0.031	
	0.063	-0.035				0.071	-0.027		
	0.068	-0.030				0.068	-0.030		
	0.069	-0.029	-0.023			0.059	-0.039	-0.037	
	0.075	-0.023				0.063	-0.035		
	0.08	-0.018				0.06	-0.038		
0.121	0.665	0.544	0.545	VI		0.068	-0.053	-0.052	
	0.649	0.528				0.065	-0.056		
	0.685	0.564				0.073	-0.048		
	0.065	-0.056	-0.054			0.073	-0.048	-0.049	
	0.072	-0.049				0.075	-0.046		
	0.065	-0.056				0.069	-0.052		
	0.067	-0.054	-0.053			0.402	0.281	0.285	VI
	0.07	-0.051				0.407	0.286		
	0.066	-0.055				0.41	0.289		
	0.08	-0.041	-0.049			0.273	0.152	0.144	VI
	0.068	-0.053				0.282	0.161		
	0.068	-0.053				0.239	0.118		
	0.059	-0.062	-0.058			0.063	-0.058	-0.055	
	0.065	-0.056				0.064	-0.057		
	0.066	-0.055				0.07	-0.051		
0.105	0.067	-0.038	-0.040			0.49	0.385	0.388	VI
	0.064	-0.041				0.495	0.390		
	0.064	-0.041				0.495	0.390		
	0.542	0.437	0.447	VI		0.067	-0.038	-0.033	
	0.563	0.458				0.07	-0.035		
	0.551	0.446				0.078	-0.027		
	0.085	-0.020	-0.013			0.086	-0.019	-0.031	
	0.089	-0.016				0.077	-0.028		
	0.103	-0.002				0.06	-0.045		
	0.274	0.169	0.167	VI		0.062	-0.043	-0.039	
	0.274	0.169				0.063	-0.042		
	0.268	0.163				0.074	-0.031		
	0.059	-0.046	-0.042			0.535	0.430	0.467	VI
	0.065	-0.040				0.524	0.419		
	0.066	-0.039				0.656	0.551		
0.061	0.412	0.351	0.340	VI		0.085	-0.020	-0.013	
	0.39	0.329				0.089	-0.016		

ANHANG

	0.4	0.339				0.103	-0.002		
	0.07	0.009	0.009			0.07	-0.035	-0.038	
	0.07	0.009				0.068	-0.037		
	0.07	0.009				0.063	-0.042		
	0.069	0.008	0.002			0.058	-0.047	-0.047	
	0.06	-0.001				0.056	-0.049		
	0.06	-0.001				0.06	-0.045		
	0.062	0.001	0.005			0.061	-0.044	-0.043	
	0.063	0.002				0.064	-0.041		
	0.074	0.013				0.062	-0.043		
	0.067	0.006	0.005			0.061	-0.044	-0.043	
	0.063	0.002				0.065	-0.040		
	0.068	0.007				0.06	-0.045		

Anhang 3G: ELISA Rohdaten Test virusinfizierte Konidien Fgso↓^{0.4}

Fgso↓ ^{0.4} hohe Viruskonzentration									
A (405 nm)			A (405 nm)						
Ø NK	Probe	Korr. Wert	Ø Korr. Wert	VI/VF	Ø NK	Probe	Korr. Wert	Ø Korr. Wert	VI/VF
0.059	0.065	0.006	0.015			0.064	0.005	-0.001	
	0.073	0.014				0.057	-0.002		
	0.083	0.024				0.053	-0.006		
	0.106	0.047	0.026			0.072	0.013	0.007	
	0.078	0.019				0.059	0.000		
	0.071	0.012				0.066	0.007		
	0.07	0.011	0.011			0.073	0.014	0.009	
	0.07	0.011				0.064	0.005		
	0.07	0.011				0.067	0.008		
	0.069	0.010	0.004			0.057	-0.002	0.002	
	0.06	0.001				0.063	0.004		
	0.06	0.001				0.063	0.004		
	0.059	0.000	-0.003			0.057	-0.002	-0.004	
	0.055	-0.004				0.056	-0.003		
	0.055	-0.004				0.053	-0.006		
0.060	0.065	0.005	0.013			0.067	0.007	0.007	
	0.061	0.001				0.072	0.012		
	0.092	0.032				0.061	0.001		
	0.889	0.829	0.864	VI		0.061	0.001	0.007	
	0.909	0.849				0.071	0.011		
	0.974	0.914				0.068	0.008		
	0.067	0.007	0.006			0.086	0.026	0.014	
	0.063	0.003				0.077	0.017		
	0.068	0.008				0.06	0.000		
	0.069	0.009	0.015			0.062	0.002	0.006	
	0.075	0.015				0.063	0.003		
	0.08	0.020				0.074	0.014		
	0.073	0.013	0.014			0.071	0.011	0.012	
	0.069	0.009				0.065	0.005		
	0.08	0.020				0.081	0.021		
0.210	0.232	0.022	0.019			0.22	0.010	0.003	
	0.225	0.015				0.204	-0.006		
	0.23	0.020				0.215	0.005		
	0.234	0.024	0.030			0.175	-0.035	-0.029	
	0.238	0.028				0.176	-0.034		
	0.249	0.039				0.191	-0.019		
	0.207	-0.003	-0.011			0.204	-0.006	-0.012	
	0.188	-0.022				0.201	-0.009		
	0.203	-0.007				0.19	-0.020		
	0.191	-0.019	-0.008			0.195	-0.015	-0.019	
	0.201	-0.009				0.177	-0.033		
	0.215	0.005				0.2	-0.010		

ANHANG

	0.205	-0.005	-0.014			0.214	0.004	0.012		
	0.198	-0.012				0.216	0.006			
	0.186	-0.024				0.235	0.025			
0.198	0.218	0.020	0.029			0.346	0.148	0.128	VI	
	0.216	0.018				0.313	0.115			
	0.246	0.048				0.319	0.121			
	0.225	0.027	0.032			0.218	0.020			
	0.231	0.033				0.217	0.019			
	0.234	0.036				0.25	0.052			
	0.219	0.021	0.023			0.197	-0.001	0.030		
	0.223	0.025				0.198	0.000			
	0.222	0.024				0.203	0.005			
	0.21	0.012	0.027			0.201	0.003	0.013		
	0.219	0.021				0.217	0.019			
	0.246	0.048				0.214	0.016			
	0.264	0.066	0.051			0.382	0.184	0.182	VI	
	0.233	0.035				0.371	0.173			
	0.25	0.052				0.386	0.188			
0.297	0.295	-0.002	-0.032			0.262	-0.035	-0.047		
	0.262	-0.035				0.248	-0.049			
	0.239	-0.058				0.239	-0.058			
	0.249	-0.048	-0.031			0.276	-0.021	-0.028		
	0.278	-0.019				0.256	-0.041			
	0.272	-0.025				0.276	-0.021			
	0.254	-0.043	-0.055			0.309	0.012	0.013		
	0.242	-0.055				0.315	0.018			
	0.23	-0.067				0.307	0.010			
	0.235	-0.062	-0.064			0.239	-0.058	-0.071		
	0.226	-0.071				0.213	-0.084			
	0.238	-0.059				0.227	-0.070			
	0.407	0.110	0.137	VI		0.39	0.093	0.087	VI	
	0.427	0.130				0.352	0.055			
	0.468	0.171				0.41	0.113			
0.061	0.061	0.000	0.001			0.071	0.010	0.011		
	0.064	0.003				0.065	0.004			
	0.062	0.001				0.081	0.020			
	0.062	0.001	-0.002			0.073	0.012	0.013		
	0.06	-0.001				0.069	0.008			
	0.055	-0.006				0.08	0.019			
	0.069	0.008	0.004			0.063	0.002	0.002		
	0.066	0.005				0.065	0.004			
	0.061	0.000				0.061	0.000			
	0.065	0.004	0.006			0.092	0.031	0.010		
	0.06	-0.001				0.062	0.001			
	0.076	0.015				0.06	-0.001			
	0.072	0.011	0.005			0.055	-0.006	0.002		
	0.059	-0.002				0.069	0.008			
	0.066	0.005				0.066	0.005			
Fgso ^{10.4} niedrige Viruskonzentration										
A (405 nm)						A (405 nm)				
Ø NK	Probe	Korr. Wert	Ø Korr. Wert	VI/VF	Ø NK	Probe	Korr. Wert	Ø Korr. Wert	VI/VF	
0.064	0.665	0.601	0.602	VI		0.067	0.003	0.004		
	0.649	0.585				0.07	0.006			
	0.685	0.621				0.066	0.002			
	0.065	0.001	0.003			0.08	0.016	0.008		
	0.072	0.008				0.068	0.004			
	0.065	0.001				0.068	0.004			
	0.068	0.004	0.005			0.925	0.861	0.752	VI	
	0.065	0.001				0.77	0.706			
	0.073	0.009				0.752	0.688			
	0.073	0.009	0.008			0.068	0.004	0.004		

ANHANG

	0.075	0.011				0.066	0.002		
	0.069	0.005				0.069	0.005		
	0.699	0.635	0.681	VI		0.108	0.044	0.035	
	0.734	0.670				0.096	0.032		
	0.803	0.739				0.092	0.028		
0.065	0.522	0.457	0.421	VI		0.063	-0.002	-0.006	
	0.455	0.390				0.061	-0.004		
	0.481	0.416				0.053	-0.012		
	0.535	0.470	0.507	VI		0.062	-0.003	0.002	
	0.524	0.459				0.063	-0.002		
	0.656	0.591			0.075	0.010			
	0.49	0.425	0.428	VI		0.066	0.001	0.001	
	0.495	0.430				0.068	0.003		
	0.495	0.430				0.064	-0.001		
	0.067	0.002	0.003			0.06	-0.005	-0.007	
	0.07	0.005				0.054	-0.011		
	0.066	0.001				0.061	-0.004		
	0.06	-0.005	-0.004			0.256	0.191	0.201	
	0.063	-0.002				0.248	0.183		
	0.061	-0.004				0.294	0.229		
0.063	0.925	0.862	0.753			0.09	0.027	0.015	
	0.77	0.707				0.075	0.012		
	0.752	0.689				0.07	0.007		
	0.068	0.005	0.005			0.067	0.004	0.005	
	0.066	0.003				0.07	0.007		
	0.069	0.006				0.066	0.003		
	0.066	0.003	0.001			0.08	0.017	0.009	
	0.064	0.001				0.068	0.005		
	0.062	-0.001				0.068	0.005		
	0.094	0.031	0.016			0.665	0.602	0.603	VI
	0.069	0.006				0.649	0.586		
	0.074	0.011				0.685	0.622		
	0.062	-0.001	0.006			0.065	0.002	0.004	
	0.075	0.012				0.072	0.009		
	0.069	0.006				0.065	0.002		
0.070	0.068	-0.002	-0.001			0.102	0.032	0.030	
	0.065	-0.005				0.102	0.032		
	0.073	0.003				0.096	0.026		
	0.073	0.003	0.002			0.24	0.170	0.172	VI
	0.075	0.005				0.217	0.147		
	0.069	-0.001				0.268	0.198		
	0.402	0.332	0.336	VI		0.311	0.241	0.229	VI
	0.407	0.337				0.293	0.223		
	0.41	0.340				0.294	0.224		
	0.273	0.203	0.195	VI		0.906	0.836	0.835	VI
	0.282	0.212				0.877	0.807		
	0.239	0.169				0.933	0.863		
	0.066	-0.004	-0.009			0.06	-0.010	-0.006	
	0.063	-0.007				0.068	-0.002		
	0.054	-0.016				0.064	-0.006		
0.131	0.255	0.124	0.131	VI		0.144	0.013	0.016	
	0.254	0.123				0.155	0.024		
	0.276	0.145				0.143	0.012		
	0.225	0.094	0.086	VI		0.196	0.065	0.087	VI
	0.215	0.084				0.23	0.099		
	0.212	0.081				0.227	0.096		
	0.182	0.051	0.060			0.184	0.053	0.055	
	0.193	0.062				0.184	0.053		
	0.197	0.066				0.189	0.058		
	0.301	0.170	0.151	VI		0.364	0.233	0.242	VI
	0.269	0.138				0.314	0.183		

ANHANG

	0.276	0.145				0.44	0.309			
	0.199	0.068	0.084	VI		0.217	0.086	0.082	VI	
	0.215	0.084				0.204	0.073			
	0.23	0.099				0.218	0.087			
0.136	0.139	0.003	-0.001			0.255	0.119	0.125	VI	
	0.14	0.004				0.264	0.128			
	0.125	-0.011				0.264	0.128			
	0.533	0.397	0.378	VI		0.206	0.070	0.060		
	0.513	0.377				0.193	0.057			
	0.496	0.360				0.189	0.053			
	0.146	0.010	0.004			0.5	0.364	0.333	VI	
	0.131	-0.005				0.459	0.323			
	0.142	0.006				0.448	0.312			
	0.144	0.008	-0.002			0.136	0.000	0.006		
	0.126	-0.010				0.14	0.004			
	0.133	-0.003				0.15	0.014			
	0.32	0.184	0.187	VI		0.141	0.005	0.003		
	0.328	0.192				0.119	-0.017			
	0.322	0.186				0.156	0.020			

Anhang 3H: ELISA Rohdaten Test virusinfizierte Konidien Fgso^{†2.3}

Fgso ^{†2.3} hohe Viruskonzentration										
A (405 nm)			A (405 nm)							
Ø NK	Probe	Korr. Wert	Ø Korr. Wert	VI/VF	Ø NK	Probe	Korr. Wert	Ø Korr. Wert	VI/VF	
0.136	0.133	-0.003	-0.007			0.17	0.034	0.016		
	0.134	-0.002				0.146	0.010			
	0.119	-0.017				0.139	0.003			
	0.146	0.010	0.004			0.137	0.001	-0.001		
	0.131	-0.005				0.137	0.001			
	0.142	0.006				0.13	-0.006			
	0.144	0.008	-0.002			0.255	0.119	0.125	VI	
	0.126	-0.010				0.264	0.128			
	0.133	-0.003				0.264	0.128			
	0.533	0.397	0.378	VI		0.136	0.000	0.006		
	0.513	0.377				0.14	0.004			
	0.496	0.360				0.15	0.014			
	0.32	0.184	0.187	VI		0.141	0.005	0.003		
	0.328	0.192				0.119	-0.017			
	0.322	0.186				0.156	0.020			
0.064	0.665	0.601	0.602	VI		0.07	0.006	0.006		
	0.649	0.585				0.07	0.006			
	0.685	0.621				0.07	0.006			
	0.065	0.001	0.003			0.069	0.005	-0.001		
	0.072	0.008				0.06	-0.004			
	0.065	0.001				0.06	-0.004			
	0.064	0.000	0.002			0.068	0.004	0.005		
	0.066	0.002				0.065	0.001			
	0.067	0.003				0.073	0.009			
	0.699	0.635	0.681	VI		0.073	0.009	0.008		
	0.734	0.670				0.075	0.011			
	0.803	0.739				0.069	0.005			
	0.053	-0.011	-0.005			0.07	0.006	0.006		
	0.052	-0.012				0.07	0.006			
	0.073	0.009				0.07	0.006			
0.070	0.769	0.699	0.661	VI		0.49	0.420	0.423	VI	
	0.716	0.646				0.495	0.425			
	0.707	0.637				0.495	0.425			
	0.071	0.001	0.004			0.067	-0.003	0.002		
	0.075	0.005				0.07	0.000			
	0.077	0.007				0.078	0.008			
	0.073	0.003	-0.002			0.076	0.006	0.001		

ANHANG

	0.065	-0.005				0.069	-0.001		
	0.067	-0.003				0.068	-0.002		
	0.289	0.219	0.257	VI		0.522	0.452	0.416	VI
	0.338	0.268				0.455	0.385		
	0.353	0.283				0.481	0.411		
	0.06	-0.010	-0.011			0.535	0.465	0.502	VI
	0.058	-0.012				0.524	0.454		
	0.059	-0.011				0.656	0.586		
0.063	0.257	0.194	0.195	VI		0.098	0.035	0.033	
	0.243	0.180				0.091	0.028		
	0.274	0.211				0.099	0.036		
	0.061	-0.002	0.001			0.275	0.212	0.199	VI
	0.064	0.001				0.246	0.183		
	0.067	0.004				0.265	0.202		
	0.073	0.010	0.013			0.068	0.005	0.008	
	0.075	0.012				0.066	0.003		
	0.079	0.016				0.078	0.015		
	0.306	0.243	0.236	VI		0.08	0.017	0.012	
	0.286	0.223				0.074	0.011		
	0.305	0.242				0.071	0.008		
	0.077	0.014	0.020			0.067	0.004	0.008	
	0.074	0.011				0.072	0.009		
	0.098	0.035				0.075	0.012		
0.054	0.196	0.142	0.157	VI		0.058	0.004	0.006	
	0.219	0.165				0.059	0.005		
	0.217	0.163				0.062	0.008		
	0.061	0.007	0.016			0.104	0.050	0.052	
	0.066	0.012				0.102	0.048		
	0.084	0.030				0.111	0.057		
	0.068	0.014	0.014			0.07	0.016	0.018	
	0.066	0.012				0.076	0.022		
	0.07	0.016				0.069	0.015		
	0.602	0.548	0.597	VI VI		0.059	0.005	0.008	
	0.579	0.525				0.065	0.011		
	0.771	0.717				0.063	0.009		
	0.273	0.219	0.231			0.06	0.006	0.005	
	0.282	0.228				0.059	0.005		
	0.299	0.245				0.058	0.004		
0.054	0.068	0.014	0.014			0.099	0.045	0.022	
	0.065	0.011				0.063	0.009		
	0.07	0.016				0.066	0.012		
	0.066	0.012	0.013			0.061	0.007	0.010	
	0.064	0.010				0.068	0.014		
	0.072	0.018				0.064	0.010		
	0.174	0.120	0.118			0.061	0.007	0.010	
	0.17	0.116				0.057	0.003		
	0.171	0.117				0.075	0.021		
	0.068	0.014	0.013			0.13	0.076	0.063	
	0.062	0.008				0.114	0.060		
	0.07	0.016				0.107	0.053		
	0.134	0.080	0.085	VI		0.063	0.009	0.013	
	0.144	0.090				0.063	0.009		
	0.14	0.086				0.076	0.022		
Fgso↑ ^{2,3} niedrige Viruskonzentration									
A (405 nm)					A (405 nm)				
Ø NK	Probe	Korr. Wert	Ø Korr. Wert	VI/VF	Ø NK	Probe	Korr. Wert	Ø Korr. Wert	VI/VF
0.064	0.189	0.125	0.134	VI		0.417	0.353	0.352	VI
	0.178	0.114				0.414	0.350		
	0.227	0.163				0.417	0.353		
	0.388	0.324	0.332	VI		0.187	0.123	0.141	VI
	0.404	0.340				0.203	0.139		
	0.396	0.332				0.224	0.160		
	0.479	0.415	0.429	VI		0.199	0.135	0.131	VI

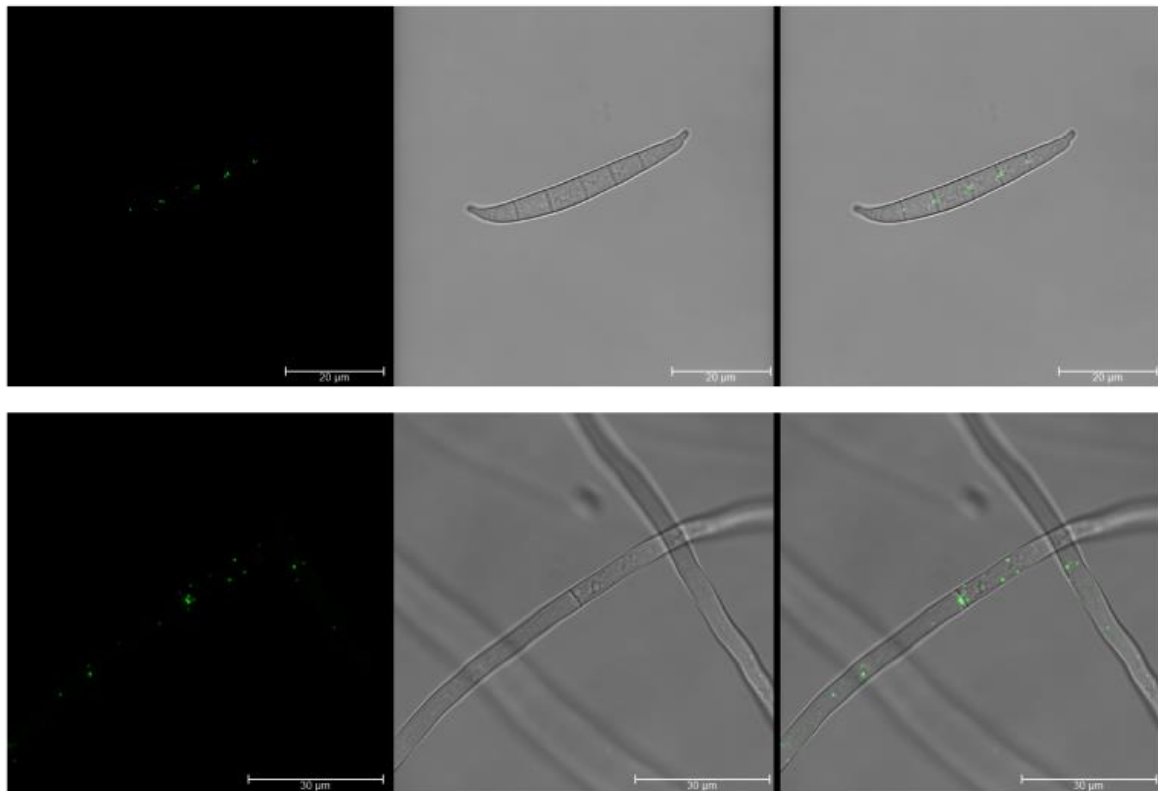
ANHANG

	0.472	0.408				0.195	0.131		
	0.529	0.465				0.19	0.126		
	0.302	0.238	0.252	VI		0.478	0.414	0.418	VI
	0.33	0.266				0.438	0.374		
	0.316	0.252				0.531	0.467		
	0.514	0.450	0.342	VI		0.194	0.130	0.134	VI
	0.408	0.344				0.184	0.120		
	0.296	0.232				0.217	0.153		
0.054	0.154	0.100	0.109	VI		0.616	0.562	0.537	VI
	0.145	0.091				0.578	0.524		
	0.189	0.135				0.58	0.526		
	0.084	0.030	0.038			0.36	0.306	0.302	VI
	0.089	0.035				0.464	0.410		
	0.103	0.049				0.243	0.189		
	0.112	0.058	0.052			0.195	0.141	0.121	VI
	0.109	0.055				0.18	0.126		
	0.098	0.044				0.151	0.097		
	0.232	0.178	0.184	VI		0.349	0.295	0.439	VI
	0.23	0.176				0.535	0.481		
	0.251	0.197				0.594	0.540		
	0.863	0.809	0.913	VI		0.23	0.176	0.153	VI
	0.885	0.831				0.199	0.145		
	1.154	1.100				0.192	0.138		
0.065	0.195	0.130	0.122	VI		0.471	0.406	0.391	VI
	0.183	0.118				0.449	0.384		
	0.184	0.119				0.449	0.384		
	0.155	0.090	0.087	VI		0.261	0.196	0.214	VI
	0.144	0.079				0.246	0.181		
	0.156	0.091				0.331	0.266		
	0.209	0.144	0.148	VI		0.108	0.043	0.044	
	0.207	0.142				0.106	0.041		
	0.224	0.159				0.113	0.048		
	0.176	0.111	0.125	VI		0.174	0.109	0.107	VI
	0.196	0.131				0.17	0.105		
	0.199	0.134				0.171	0.106		
	0.19	0.125	0.130	VI		0.196	0.131	0.146	VI
	0.184	0.119				0.219	0.154		
	0.212	0.147				0.217	0.152		
0.063	0.275	0.212	0.199	VI		0.506	0.443	0.468	VI
	0.246	0.183				0.534	0.471		
	0.265	0.202				0.553	0.490		
	0.068	0.005	0.008			0.665	0.602	0.603	VI
	0.066	0.003				0.649	0.586		
	0.078	0.015				0.685	0.622		
	0.306	0.243	0.236	VI		0.273	0.210	0.205	VI
	0.286	0.223				0.264	0.201		
	0.305	0.242				0.268	0.205		
	0.405	0.342	0.327	VI		0.925	0.862	0.753	VI
	0.385	0.322				0.77	0.707		
	0.379	0.316				0.752	0.689		
	0.257	0.194	0.195	VI		0.273	0.210	0.202	VI
	0.243	0.180				0.282	0.219		
	0.274	0.211				0.239	0.176		
0.143	0.525	0.382	0.397	VI		0.729	0.586	0.583	VI
	0.541	0.398				0.719	0.576		
	0.554	0.411				0.729	0.586		
	0.477	0.334	0.326	VI		0.249	0.106	0.114	VI
	0.458	0.315				0.263	0.120		
	0.472	0.329				0.258	0.115		
	0.541	0.398	0.383	VI		0.173	0.030	0.010	
	0.533	0.390				0.152	0.009		
	0.503	0.360				0.133	-0.010		
	0.374	0.231	0.235	VI		0.136	-0.007	-0.007	
	0.414	0.271				0.138	-0.005		

ANHANG

	0.347	0.204				0.135	-0.008		
	0.236	0.093	0.100	VI		1.782	1.639	1.660	VI
	0.286	0.143				1.743	1.600		
	0.206	0.063				1.884	1.741		
0.136	0.8	0.664	0.642	VI		0.335	0.199	0.221	VI
	0.769	0.633				0.36	0.224		
	0.765	0.629				0.377	0.241		
	0.255	0.119	0.125	VI		0.562	0.426	0.423	VI
	0.264	0.128				0.574	0.438		
	0.264	0.128				0.542	0.406		
	0.533	0.397	0.378	VI		0.5	0.364	0.333	VI
	0.513	0.377				0.459	0.323		
	0.496	0.360				0.448	0.312		
	0.32	0.184	0.187	VI		0.438	0.302	0.292	VI
	0.328	0.192				0.403	0.267		
	0.322	0.186				0.442	0.306		
	0.468	0.332	0.215	VI		0.321	0.185	0.183	VI
	0.306	0.170				0.313	0.177		
	0.28	0.144				0.322	0.186		

Anhang 4: eGFP-Hex-1 Fusionsprotein in FgPH1 VF



ANHANG

Anhang 5: Daten Wachstumstest

Anhang 5A: Rohdaten Wachstumstest auf CM-Medium

CM	Tag 1 Messung (Ø in cm)						Tag 2 Messung (Ø in cm)					
FgPH1 VF	1.4	1.1					2.34	2.56	2.51	2.46	2.31	2.41
FgPH1 VI	0.66	0.72					0.96	0.99	0.85	0.93	1	0.85
2115 VF	1.37	1.35					2.98	2.73	3.1	3.59	2.88	2.67
2115 VI	0.61	0.61					0.59	0.54	0.65	0.58	0.66	0.74
2117 VF	1.1	1.16					2.68	2.66	2.71	2.73	2.76	2.57
2117 VI	0.76	0.79					1.37	1.4	1.47	1.52	1.37	1.5
2116 VF	0.8	0.93					3.23	3.25	2.75	2.42	2.49	2.82
2120 VF	0.84	0.76					2.15	2.37	2.13	2.54	2.32	2.75
2121 VF	1.2	1.19					2.68	2.78	2.54	2.51	2.54	2.59
2121 VI	0.52	0.48					0.62	0.55	0.98	0.91	0.74	0.82
Fgso↓ ^{0.4} VF	1	0.99					2.89	2.85	2.49	2.75	2.32	2.35
Fgso↓ ^{0.4} VI	0.8	0.75					1.77	2.01	2.17	2.61	2.41	2.68
Fgso↑ ^{2.3} VF	1.18	1.08					2.49	2.3	2.11	2.08	2.2	2.2
Fgso↑ ^{2.3} VI	0.68	0.7					1.31	1.25	1.32	1.32	1.29	1.22
CM	Tag 3 Messung (Ø in cm)						Tag 4 Messung (Ø in cm)					
FgPH1 VF	4.48	4.42	4.65	4.81	4.72	4.71	7.11	7.15	7.48	7.35	6.87	6.94
FgPH1 VI	1.4	0.94	0.96	1.01	1.23	1.44	1.66	1.35	1.18	1.15	1.42	1.62
2115 VF	5.14	5.35	5.53	5.82	5.13	5.18	7.75	7.61	7.85	7.95	7.99	7.78
2115 VI	0.56	0.98	0.69	0.69	0.64	0.61	0.88	0.84	0.88	0.77	0.88	0.78
2117 VF	4.92	4.98	5.08	5.09	5.06	5.15	8	8	7.85	7.89	7.72	7.82
2117 VI	2.09	2.06	2.2	2.28	2.27	2.07	3.15	3.11	2.84	2.84	2.87	2.77
2116 VF	4.81	4.74	4.91	5.05	4.54	5.52	7.38	7.55	7.58	7.38	7.45	7.07
2120 VF	4.3	4.26	4.37	4.33	4.61	5.08	7.35	7.24	6.84	6.97	6.74	6.94
2121 VF	4.79	4.87	4.79	4.77	5.35	5.09	8	7.82	7.58	7.65	7.41	7.51
2121 VI	0.93	0.91	1.33	1.23	1.11	1.32	1.79	1.32	1.69	1.59	1.28	1.35
Fgso↓ ^{0.4} VF	4.3	4.45	4.09	4.3	4.61	5.07	7.48	7.17	6.81	7.41	7.11	7.1
Fgso↓ ^{0.4} VI	2.74	2.94	3.45	2.91	2.94	2.84	5.48	5.38	5.11	5.35	5.01	5.41
Fgso↑ ^{2.3} VF	3.92	3.58	3.67	3.79	4.16	4.57	7.42	7.62	6.6	6.74	7.21	6.5
Fgso↑ ^{2.3} VI	1.86	1.76	1.86	1.72	1.66	1.93	2.64	2.37	2.61	2.71	2.77	2.61
CM	Tag 7 Messung (Ø in cm)						Tag 11 Messung (Ø in cm)					
FgPH1 VF	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
FgPH1 VI	1.77	2.15	1.61	1.77	2.35	2.19	2.74	2.51	3.25	3.04	3.04	2.74
2115 VF	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
2115 VI	2.81	2.41	1.77	1.65	1.91	2.1	3.8	3.74	4.15	4.44	3.82	4.1
2117 VF	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
2117 VI	4.75	4.67	4.67	4.43	4.54	4.54	61.3	7.07	6.54	6.43	6.37	6.31
2116 VF	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
2120 VF	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
2121 VF	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
2121 VI	3.05	2.68	3.01	3.51	3.3	4.01	4.21	5.15	5.26	4.62	4.51	5.02
Fgso↓ ^{0.4} VF	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Fgso↓ ^{0.4} VI	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Fgso↑ ^{2.3} VF	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Fgso↑ ^{2.3} VI	3.59	3.51	3.22	3.22	3.84	3.51	4.44	4.44	4.73	5.02	4.62	4.21

Anhang 5B: Rohdaten Wachstumstest auf Minimalmedium

MM	Tag 1 Messung (Ø in cm)						Tag 2 Messung (Ø in cm)					
FgPH1 VF	0.73	0.7					1.6	1.4	1.6	1.5	1.5	1.8
FgPH1 VI	0.71	0.61					0.8	0.8	0.9	0.7	0.6	0.8
2115 VF	1.27	1.24					2.1	2.2	2.3	2.3	2	2.3
2115 VI	0.46	0.52					0.6	0.57	0.57	0.55	0.6	0.5
2117 VF	0.79	0.67					2.3	2.3	2.2	2.2	2.2	2.1
2117 VI	1.13	1.13					1.2	1.1	1.2	1.4	1.1	1.1
2116 VF	0.76	0.78					2.2	1.9	1.9	2.1	2.1	2.0
2120 VF	0.75	0.71					2.03	2.01	1.98	1.73	1.74	1.9
2121 VF	1.1	1.1					2.4	2.4	2.1	2.2	2.3	2.3
2121 VI	0.6	0.57					0.81	0.81	0.79	0.88	0.79	0.81

ANHANG

MM	Tag 1 Messung (Ø in cm)						Tag 2 Messung (Ø in cm)					
Fgso↓ ^{0.4} VF	0.85	0.81					1.8	1.9	2	2.1	2.1	2.2
Fgso↓ ^{0.4} VI	0.59	0.69					2	2.1	1.6	1.5	1.48	1.48
Fgso↑ ^{2.3} VF	1.02	0.98					2.3	2.4	2.25	2.44	2.08	2.49
Fgso↑ ^{2.3} VI	0.59	0.54					0.86	0.71	0.95	0.95	1	1.1
MM	Tag 3 Messung (Ø in cm)						Tag 4 Messung (Ø in cm)					
FgPH1 VF	3.92	3.72	3.82	3.82	3.49	3.79	5.99	6.12	6.16	6.19	6.26	6.46
FgPH1 VI	0.95	0.98	1.02	0.81	1.12	0.98	1.82	1.69	1.66	1.62	1.62	1.62
2115 VF	3.89	3.72	3.89	3.72	3.35	3.79	6.19	5.76	5.99	6.6	5.82	6.46
2115 VI	0.61	0.71	0.81	0.71	0.64	0.71	0.74	0.67	0.91	0.71	0.91	0.74
2117 VF	3.31	3.45	3.49	3.59	3.96	3.96	6.4	7.01	6.09	5.55	6.5	5.58
2117 VI	1.72	1.62	2.03	1.86	1.59	1.42	2.37	2.37	2.53	2.57	2.27	2.24
2116 VF	4.16	3.86	4.19	4.16	4.09	3.75	6.29	6.53	6.36	6.97	6.5	6.73
2120 VF	3.89	3.72	3.86	3.75	3.75	3.28	6.47	5.77	6.57	6.47	6.26	6.23
2121 VF	4.13	4.36	3.79	3.42	4.16	4.19	6.97	7.11	6.5	6.31	7.07	6.23
2121 VI	1.08	1.01	1.11	1.08	1.05	1.15	1.89	1.79	1.55	1.49	1.82	1.55
Fgso↓ ^{0.4} VF	4.4	3.79	4.09	3.99	3.79	3.89	6.5	6.4	6.73	6.5	6.56	6.94
Fgso↓ ^{0.4} VI	3.52	3.39	3.69	3.65	3.52	3.62	5.01	5.11	4.47	5.28	5.58	5.31
Fgso↑ ^{2.3} VF	3.38	2.95	3.38	3.65	2.88	3.22	4.91	5.07	5.25	4.74	4.94	4.94
Fgso↑ ^{2.3} VI	1.42	1.32	1.28	1.18	1.05	1.08	1.86	1.55	1.72	1.76	1.96	1.99
MM	Tag 7 Messung (Ø in cm)						Tag 11 Messung (Ø in cm)					
FgPH1 VF	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
FgPH1 VI	2.35	2.52	2.76	2.6	2.44	2.44	3.3	3.26	3.8	3.26	3.05	3.88
2115 VF	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
2115 VI	1.61	1.32	1.81	2.02	1.94	1.69	4.5	3.72	4.09	4.09	3.95	4.01
2117 VF	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
2117 VI	3.725	4.01	4.38	4.5	4.01	4.88	6.45	7.27	6.53	6.94	6.98	7.01
2116 VF	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
2120 VF	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
2121 VF	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
2121 VI	4.46	3.88	3.72	3.3	3.35	3.1	6.07	5.66	6.03	6.36	6.45	6.78
Fgso↓ ^{0.4} VF	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Fgso↓ ^{0.4} VI	7.27	7.23	7.52	6.98	6.53	7.11	8	8	8	8	8	8
Fgso↑ ^{2.3} VF	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Fgso↑ ^{2.3} VI	3.18	3.01	3.14	3.51	3.55	3.59	4.71	4.38	4.44	4.51	4.02	4.82

DANKSAGUNG

Danksagung

Eine Dissertation fertigt man nicht allein an. Daher möchte ich mich an erster Stelle bei meiner Betreuerin PD Dr. Cornelia Heinze bedanken. Vielen Dank für die Möglichkeit zur Bearbeitung dieses interessanten Projektes. Ich danke Dir, für die großartige Betreuung und Unterstützung, das entgegengebrachte Vertrauen und den stetigen Austausch. Du warst immer da!

Ebenso gilt mein großer Dank Prof. Dr. Stefan Hoth, der mich all meine Jahre in Klein Flottbek begleitet hat. Stefan, ich danke Dir von Herzen für deinen Rat, die Gespräche sowie deine selbstlose und umfassende Hilfe in schwierigen Zeiten.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Dominik Begerow dafür bedanken, dass er ohne zu zögern die Rolle meines Zweitgutachters übernommen hat.

Diese Arbeit wäre ohne die Hilfe Birgit Hadelers nicht möglich gewesen. Ich danke dir für deine unerschöpfliche Hilfe und Expertise im Labor sowie für die schönen Stunden auf der A7.

Ohne Tobias Lutz hätte ich in den letzten Jahren mit Sicherheit nicht annähernd so viel gelacht und Spaß gehabt. Danke für die zahlreichen Diskussionen, Danke für die wohlverdienten Kaffeepausen, Danke für die tolle Zeit!

Ebenso gilt mein Dank Tim Lienemann, der mir über die Jahre ein guter Freund geworden ist. Vielen Dank für deine Unterstützung und die Sushi-Abende.

Auch Christiane Debus möchte ich für ihre hilfreichen Tipps und die Unterstützung bei all meinen bürokratischen Problemen danken.

In meiner Zeit als Doktorandin durfte ich mit einigen Studenten und Praktikanten zusammenarbeiten. Ich bedanke mich bei Allen, die ich betreuen durfte und die meinen Laboralltag bereichert haben. Ein besonderer Dank gilt hierbei Miguel, Marcy, Cibebe, Elma, Robert und Lea.

Meiner Familie, Rebecca, Alena und Juan möchte ich an dieser Stelle meinen besonderen Dank aussprechen. Ihr habt mich immer unterstützt und an mich geglaubt. Wir sind durch gute Zeiten und durch schwere Zeiten gegangen und am Ende hat sich alles gelohnt. Vielen Dank! Ohne euch wäre ich jetzt nicht hier.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig verfasst wurde und ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel – insbesondere keine im Quellenverzeichnis nicht benannten Internet-Quellen – benutzt habe.

Hamburg, den 13. Oktober 2023

Mareike Jaeckel