



Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Naturwissenschaftliche Fakultät III

Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften

Phytopathologie und Pflanzenschutz

**Ein einziger Aminosäureaustausch im
Transkriptionsfaktor Azr1 erzeugt
Azolresistenz in *Fusarium graminearum***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Frau M. Sc. Iris Eisermann

geb. am 02.07.1986 in Schwerte

Gutachter: Prof. Dr. Holger B. Deising
Prof. Dr. Andreas von Tiedemann

Verteidigung am: 17.07.2023

Inhaltsverzeichnis

1	Anmerkungen zur Schreibweise	7
2	Einleitung.....	8
2.1	Der Beitrag von Fungiziden für die Ertragssicherung	8
2.2	Das Pflanzenpathogen <i>Fusarium graminearum</i> Schwabe	9
2.2.1	Die Einordnung von <i>F. graminearum</i> sensu stricto in die Systematik der FHB verursachenden <i>Fusarium</i> -Spezies.....	9
2.2.2	Lebenszyklus und Wirtspflanzenspektrum von <i>F. graminearum</i>	10
2.2.3	Die Produktion pilzlicher Sekundärmetabolite durch <i>F. graminearum</i>	12
2.2.4	Durch FHB hervorgerufene Schäden und potenzielle Gegenmaßnahmen.....	16
2.3	Die Wirkungsweise von Azol-Fungiziden und Mechanismen der Azol-Resistenzentwicklung	18
2.3.1	Azol-Fungizide und deren Wirkungsmechanismus auf die Sterolbiosynthese in pilzlichen Membranen.....	18
2.3.2	Mechanismen der Resistenzentwicklung gegen Azol-Fungizide	20
2.3.2.1	Der Einfluss von Veränderungen am Angriffspunkt auf die Resistenz gegenüber Azol-Fungiziden	21
2.3.2.2	Der Einfluss von Efflux-Transportern auf die Resistenz gegenüber Azol-Fungiziden	22
2.3.2.3	Der Einfluss von Transkriptionsfaktoren auf die Resistenz gegenüber Azol-Fungiziden	23
2.4	Zielstellung	29
3	Material und Methoden	30
3.1	Biologisches Material	30
3.1.1	<i>Fusarium graminearum</i>	30
3.1.1.1	Verwendete Stämme.....	30

3.1.1.2 Kultivierung und Lagerung	30
3.1.2 <i>Escherichia coli</i>	31
3.1.2.1 Verwendete Stämme.....	31
3.1.2.2 Kultivierung und Lagerung	31
3.1.3 Pflanzen	31
3.1.3.1 Verwendete Sorten	31
3.1.3.2 Anzuchtbedingungen.....	32
3.2 Molekularbiologische Methoden	33
3.2.1 Präparation von Nukleinsäuren.....	33
3.2.1.1 Präparation von genomischer DNA aus <i>F. graminearum</i>	33
3.2.1.1.1 Mini-Präparation	33
3.2.1.1.2 Maxi-Präparation	33
3.2.1.2 Präparation von Plasmid-DNA.....	34
3.2.1.3 Präparation von Gesamt-RNA aus Pilzmyzel	34
3.2.1.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	35
3.2.1.5 Qualitätsbestimmung der RNA.....	35
3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	36
3.2.2.1 Standard-PCR.....	36
3.2.2.2 <i>Double-Joint-PCR</i>	37
3.2.2.3 RT-PCR.....	39
3.2.3 Gelelektrophorese.....	39
3.2.4 Klonierung von DNA-Fragmenten in <i>Escherichia coli</i>	40
3.2.4.1 Erzeugung von DNA-Fragmenten	40
3.2.4.2 Ligation von DNA-Fragmenten mit Plasmid-DNA.....	40
3.2.4.3 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	40
3.2.5 Transformation von <i>Fusarium graminearum</i>	41

3.2.6 Southern-Blot-Hybridisierung.....	42
3.2.6.1 Herstellung Digoxigenin-markierter Sonden	42
3.2.6.2 Restriktionshydrolyse von DNA	43
3.2.6.3 Fixierung, Hybridisierung und Detektion.....	43
3.2.7 Sanger-Sequenzierung.....	45
3.2.8 Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung (RNA-Seq)	45
3.2.9 <i>Cleaved Amplified Polymorphic Sequences</i> (CAPS) Marker Analyse.....	46
3.3 Vitalitätsbestimmung	47
3.3.1 Bestimmung der Sporenmorphologie und der Sporenkeimung	47
3.3.2 Bestimmung des vegetativen Wachstums	47
3.3.3 Test auf Fähigkeit zur sexuellen Reproduktion	48
3.4 Infektionsexperimente	48
3.4.1 Inokulation der Stängel von vorverwundeten Maispflanzen	48
3.4.2 Inokulation der Blütchen von Weizenpflanzen	49
3.4.3 Inokulation von mit Fungizid vorbehandelten Weizenähren	49
3.5 Ermittlung der Fungizidsensitivität.....	50
3.5.1 Bestimmung der ED50- und ED90-Werte.....	50
3.5.2 Bestimmung der Fungizidresistenz in Mikrotiterplatten.....	50
3.6 Bestimmung der <i>in vitro</i> Mykotoxinproduktion	52
3.7 Statistische und Bioinformatische Analysen	53
3.7.1 <i>In silico</i> Analysen	54
3.7.2 Phylogenetische Analyse	54
3.7.3 Bestimmung der ED-Werte	55
3.8 Mikroskopie.....	56
4 Ergebnisse.....	57
4.1 Der Transkriptionsfaktor Azr1	57

4.1.1	Struktur und Vorhersage der Funktion von FgAZR1	57
4.1.2	Azr1 ist am stärksten innerhalb der Gattung <i>Fusarium</i> konserviert.....	58
4.1.3	Erzeugung von AZR1 Deletions-, Allelaustausch- und Kontrolltransformanten für die funktionale Analyse von Azr1	60
4.2	Charakterisierung der erzeugten Mutanten und Transformanten.....	62
4.2.1	Testung auf verschiedene Merkmale der Vitalität	62
4.2.2	Die <i>azr1</i> ^{S368Y} - und die Δ <i>azr1</i> Mutanten zeigen gegenüber dem Wildtypisolat keine Virulenzdefizite.....	65
4.2.3	Fungizidtests.....	67
4.2.4	Mykotoxinanalysen	71
4.3	Azr1 beeinflusst die Transkription zahlreicher Gene.....	73
4.3.1	Anzahl der signifikant differentiell exprimierten Gene (DEGs) unter Standardbedingungen und unter Fungizid-Stress	73
4.3.2	Betrachtung besonders interessanter differentiell exprimierter Gene (DEGs)	76
4.3.2.1	Interessante DEGs der <i>azr1</i> ^{S368Y} Mutanten.....	77
4.3.2.2	Interessante DEGs der Δ <i>azr1</i> Mutanten.....	79
4.3.2.3	Azr1 kontrolliert die Expression von Sekundärmetabolit-Clustern	83
4.3.2.4	Azr1 kontrolliert die Expression von Genen der Ergosterolbiosynthese	89
4.3.2.5	Die Expression von Azr1 im Zusammenhang mit Fungizid-Stress	90
4.4	CAPS Marker Test und dessen Bedeutung für die Untersuchung von Feldisolaten	90
5	Diskussion	93
5.1	Der uncharakterisierte Transkriptionsfaktor Azr1 ist innerhalb der <i>Fusarium</i> -Spezies hoch konserviert.....	94
5.2	Charakterisierung von Azr1	95
5.2.1	Die vegetative Vitalität der AZR1 Mutanten ist unbeeinträchtigt.....	95
5.2.2	AZR1 Mutanten sind virulent und beeinflussen die Transkription von Sekundärmetabolit-Genen	96

5.2.3 Der Aminosäureaustausch in Azr1 erhöht die Toleranz gegenüber Azol-Fungiziden	100
5.3 Feldisolate	105
6 Zusammenfassung.....	106
7 Literaturverzeichnis	108
8 Anhang.....	139
8.1 Ergänzende Abbildungen und Tabellen.....	139
8.2 Abbildungsverzeichnis.....	177
8.3 Tabellenverzeichnis	178
8.4 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	179
8.4.1 Nährmedien.....	179
8.4.2 Puffer und Lösungen	181
8.4.3 Vektoren.....	185
8.4.4 Oligonukleotide	186
8.5 Abkürzungsverzeichnis	189
8.6 Curriculum vitae	192
8.7 Danksagung	197
8.8 Eidesstattliche Erklärung	198

1 Anmerkungen zur Schreibweise

Fremdsprachige Fachbegriffe wurden, wenn dies als sinnvoll erachtet wurde, in das Deutsche übersetzt. Für alle anderen Fälle wurden die Originalbegriffe beibehalten, diese jedoch in Kursivschrift wiedergegeben. Produktbezeichnungen und Abkürzungen fremdsprachiger Begriffe sind hiervon ausgenommen. Zudem wurden alle wissenschaftlichen Namen von Organismen in Kursivschrift geschrieben (z.B. *E. coli*). Benennungen von Genen sind in Versalien und kursiv geschrieben (z.B. *AZR1*). Bei den Proteinnamen folgen dem ersten recte Versal recte Minuskeln (z.B. *Azr1*). Mutanten-Bezeichnungen sind in Minuskeln und kursiv geschrieben (z.B. *Δazr1*). Im Rahmen dieser Arbeit wird zwischen biologischen und technischen Wiederholungen differenziert. Ein Experiment wird zu einem bestimmten Zeitpunkt mit mehreren technischen Wiederholungen durchgeführt. Die technischen Wiederholungen sind demnach zu diesem Zeitpunkt den exakt gleichen Versuchsbedingungen ausgesetzt. Bei der Wiederholung dieses Experimentes zu einem anderen Zeitpunkt wird hingegen von einer biologischen Wiederholung gesprochen.

2 Einleitung

2.1 Der Beitrag von Fungiziden für die Ertragsicherung

Drei Milliarden Menschen weltweit konnten sich 2021 keine gesunde Ernährung leisten (FAO 2021). Dennoch wird die Weltbevölkerung bis 2050 auf 9,7 Milliarden Menschen anwachsen (Nations 2019). Während die Nachfrage nach Nahrungsmitteln also zunehmend ansteigt, sinkt die verfügbare Ackerfläche pro Kopf. Um unter diesen Bedingungen eine ausreichende Versorgung gewährleisten zu können, müsste die landwirtschaftliche Produktion bis 2050 um bis zu 54 % steigen (FAO 2018).

In den letzten Jahrzehnten haben vor allem die Züchtung von Hochertragsorten, der Einsatz von synthetischen Pflanzenschutz- und Düngemitteln, sowie die Installation von Bewässerungsanlagen massiv zur Produktionssteigerung beigetragen (Evenson and Gollin 2003; Meemken and Qaim 2018; Qaim 2017). Besonders in den Industriestaaten steht allerdings ein steigender Teil der Konsumenten vor allem den synthetischen Pflanzenschutzmitteln aus gesundheitlichen und umwelttechnischen Gründen kritisch gegenüber (Klumper et al. 2013; Funk 2016; Seufert et al. 2017; e.V. 2017). Dabei hat sich die Nahrungsmittelqualität durch die Einführung synthetischer Pflanzenschutzmittel verbessert und viele Länder haben synthetische Pflanzenschutzmittel als unersetzlich eingestuft (Keulemans 2019; National Research Council 2000; Knutson 1997; Oerke and Dehne 2004; Jorgenson 1999; Rosling 2018; Deising et al. 2019). Laut Umweltbundesamt werden in Deutschland jährlich 8,8 kg Pflanzenschutzmittel je Hektar Anbaufläche eingesetzt (Umweltbundesamt 2022). Allein durch den Verzicht von Fungiziden zur Bekämpfung von Krankheiten würde Deutschland 12,6 % seiner jährlichen Ernte einbüßen. Um diesen Ausfall weltweit kompensieren zu können, müssten zusätzlich 1,2 Millionen Hektar Land neu in Ackerland umgewandelt werden. Hochrechnungen zufolge würden allein dadurch 260 Millionen Tonnen CO₂-Äquivalente zusätzlich emittiert werden (Noleppa 2013). Interessanterweise sind mehr als 96 % der zugelassenen Wirkstoffe keiner Giftklasse zugeordnet. Weitere Sicherheit gewährleisten gesetzlich festgelegte Grenzwerte für Pflanzenschutzmittelrückstände (Tiedemann 2015). Dagegen stellen die natürlicherweise vorkommenden Mykotoxine (Schimmelpilzgifte) eine weitaus größere Bedrohung für die menschliche Gesundheit dar. Im Verlauf der Geschichte konnten zahlreiche Vergiftungserscheinungen bei Menschen mit Mykotoxin-kontaminiertem Getreide in Verbindung gebracht werden (Desjardins and Proctor 2007). Jedes Jahr gibt es vor allem in den sich entwickelnden Ländern zahlreiche Fälle von akuten sowie chronischen Vergiftungserscheinungen. Aus diesem Grund existieren heutzutage in vielen Ländern Grenzwerte für Mykotoxingehalte in Nahrungs- und Futtermitteln. Das Europäische Parlament hat die maximal zulässigen Höchstgehalte für Mykotoxine in der EG-Verordnung Nr. 1881/2006 und in der Richtlinie 2002/32/EG festgeschrieben. Ferner existiert die Empfehlung

2006/576/EG, in welcher Richtwerte für Mykotoxine in Futtermitteln festgelegt sind. Hier zeigt sich in besonderem Maße, wie wichtig der Einsatz von Fungiziden für den Schutz der Verbraucher ist. Dieser Aspekt wird u. a. am Beispiel der *Fusarium*-Toxine deutlich. Durch den Einsatz von Fungiziden kann der Befall mit Fusarienpilzen um bis zu eine 10er-Potenz reduziert werden (Dietrichs 2012). Allerdings haben sich in den vergangenen Jahrzehnten weltweit zahlreiche Resistenzen gegenüber Fungiziden ausgebildet und zum Verlust ganzer Fungizidklassen geführt (Hewitt 1998). Zum Beispiel führten bei den Strobilurinen bereits zwei Jahre nach Markteinführung Punktmutationen mit der Konsequenz eines einzigen Aminosäureaustausches in zahlreichen Pilzen zu dem kompletten oder teilweisen Verlust der Wirksamkeit dieser Fungizidklasse (Bartels 2000; Kim et al. 2003; Kröcher 2000; Lesemann et al. 2006). Sich derartig entwickelnde Fungizidresistenzen würden besonders im Fall von *Fusarium*-Arten, wie *Fusarium graminearum*, die zu den bedeutendsten Produzenten von Mykotoxinen zählen, schwerwiegende gesundheitliche sowie ökonomische Folgen nach sich ziehen (Eskola et al. 2020).

2.2 Das Pflanzenpathogen *Fusarium graminearum* Schwabe

2.2.1 Die Einordnung von *F. graminearum* sensu stricto in die Systematik der FHB verursachenden *Fusarium*-Spezies

Bei dem Pflanzenpathogen *Fusarium graminearum* (Teleomorph: *Gibberella zeae* (Schwein.), Petch, 1936) handelt es sich um einen Pilz von dem Stamm der Ascomycota, welcher zu der Gattung *Fusarium* gehört (Sutton 1982; Leslie and Summerell 2006). Diese Gattung umfasst circa 150 verschiedene Arten (Seifert and Gams 2011). Die Art *F. graminearum* sensu stricto gehört zu dem sogenannten *F. graminearum* Spezieskomplex (FGSC), welcher auch als *F. graminearum* sensu lato bezeichnet wird und eine Pflanzenkrankheit namens Ährenfusariose bzw. partielle Taubährigkeit am Getreide verursacht (*Fusarium head blight* (FHB)). Außerdem können die FHB verursachenden Pathogene Keimlings-, Fuß-, Kronen- und Wurzelkrankheiten hervorrufen (Becher 2013; Gardiner et al. 2013). FHB wurde erstmalig 1884 in England beschrieben und führt seitdem in Nordamerika, Europa und China regelmäßig zu starken Ertragsausfällen (Parry et al. 1995; Shaner 2003; Goswami and Kistler 2004). Phylogenetische Analysen unter Verwendung mehrerer *single-copy* Gene zeigten, dass mehrere Spezies im FGSC vereint sind. Mit Hilfe dieser phylogenetischen Analysen konnte zunächst zwischen sieben Spezies (Abstammungslinien), später dann zwischen neun verschiedenen Spezies unterschieden werden (O'Donnell et al. 2000; O'Donnell et al. 2004). Bei diesen Spezies handelte es sich um *F. austroamericanum* (Spezies 1), *F. meridionale* (Spezies 2), *F. boothii* (Spezies 3), *F. mesoamericanum* (Spezies 4), *F. acaciae-mearnsii* (Spezies 5), *F. asiaticum* (Spezies 6), *F. graminearum* (Spezies 7), *F. cortaderiae* (Spezies 8) und *F. brasilicum* (Spezies 9). Diese Spezies unterscheiden sich

deutlich von anderen FHB verursachenden Spezies wie z.B. *F. culmorum*, *F. avenaceum* und *F. poae*, welche in Europa ebenfalls eine Rolle spielen (Parry et al. 1995; Xu and Nicholson 2009). Unter Einbeziehung weiterer Gene und zahlreicher Isolate aus vielen unterschiedlichen Regionen der Welt konnten in Folgearbeiten weitere Spezies innerhalb des FGSC identifiziert werden (O'Donnell et al. 2008; Starkey et al. 2007; Yli-Mattila et al. 2009; Desjardins and Proctor 2011; Sarver et al. 2011). Viele Populationsstudien haben zudem gezeigt, dass selbst *F. graminearum* sensu stricto innerhalb von Feldpopulationen bzw. innerhalb von Populationen aus bestimmten Regionen eine hohe genetische Variabilität aufweist (Gale et al. 2002; Gale et al. 2011; Gale et al. 2007; Guo et al. 2008; Naef and Defago 2006; Talas et al. 2011; Karugia et al. 2009; Suga et al. 2008; Lee et al. 2009). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Spezies *F. graminearum* sensu stricto, welche im Mittelpunkt dieser Arbeit stand, unter all den Spezies innerhalb des FGSC weltweit die bedeutendste FHB verursachende Spezies darstellt.

2.2.2 Lebenszyklus und Wirtspflanzenspektrum von *F. graminearum*

F. graminearum wird primär mit der Infektion von agronomisch bedeutenden Monokotyledonen wie Weizen, Gerste, Mais und Reis in Verbindung gebracht, aber es zählen auch andere ein- und mehrjährige mono- und dikotyle Pflanzen zum Wirtspflanzenkreis (Kim et al. 2018; Leslie and Summerell 2006; Nyvall et al. 1999; Logrieco et al. 2002; Stack 2003; Atanasoff 1920). Aus forschungstechnischer Sicht ist es erwähnenswert, dass *F. graminearum* auch die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* unter Laborbedingungen zu infizieren vermag (Urban et al. 2002; Skadsen and Hohn 2004).

Bei *F. graminearum* handelt es sich um ein nekrotrophes Pathogen, welches saprophytisch auf Pflanzen- bzw. Ernterückständen bis zu drei Jahre lang überdauern kann (Dill-Macky 2008; Pereyra et al. 2004). Die auf derartigen Ernterückständen gebildeten asexuellen Makrokonidien und sexuellen Askosporen stellen das Inokulum für die nächste Infektion mit *F. graminearum* dar (Abb. 1). Askosporen gelten als Überdauerungsform und werden zudem als die primäre Quelle einer Infektion betrachtet. Sie werden in Abhängigkeit von der Temperatur und der relativen Luftfeuchtigkeit aus schwarzen, kolbenförmigen Perithezien freigesetzt und mit Hilfe des Windes verbreitet (Trail and Common 2000; Trail et al. 2005). Daneben werden die drei- bis siebenzelligen, bananenförmigen Makrokonidien in schleimigen, orangefarbenen Sporodochien in Abhängigkeit von Temperatur und relativer Luftfeuchtigkeit gebildet und überwiegend durch Regenspritzer verbreitet (Doohan et al. 2003; Xu 2003; Rossi et al. 2002). Eine Infektion der Ähre erfolgt während der Anthese bei einem BBCH Code von 65. Nach erfolgreicher Keimung der Sporen kolonisieren die Hyphen zunächst die äußeren Blütenoberflächen. Durch die Ausbildung von Infektionshyphen, Infektionskissen oder gelappten Appressorien erfolgt anschließend die Penetration der Epidermiszellen (Bushnell et al. 2003; Boenisch

and Schafer 2011; Kang and Buchenauer 2000). Zunächst durchwachsen die Hyphen asymptomatisch das lebende Wirtsgewebe, verursachen aber schließlich nach zwei bis drei Tagen Nekrosen (Kazan et al. 2012). Interessanterweise hängt es von der Wirtspflanze ab, ob *F. graminearum*, wie im Fall von Weizen, sich von einem Ährchen zum nächsten ausbreiten kann. Im Fall von Gerste ist dies z. B. nicht möglich, was die Gerste aus diesem Grund widerstandsfähiger gegenüber einer Infektion mit *F. graminearum* macht. Dieser Vorgang ist abhängig von Trichothecenen wie z.B. Deoxynivalenol (DON), deren Produktion unter anderem durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Polyamine und/ oder niedrigen pH-Wert ausgelöst wird (Jansen et al. 2005; Kazan et al. 2012; Walter et al. 2010). Programmierter Zelltod sowie die Produktion von Wasserstoffperoxid sind die Folgen (Desmond et al. 2008; Feinberg and McLaughlin 1989). Die Hyphen penetrieren schließlich das Xylem, die Kolonisierung weitet sich durch das Parenchym bis zum Chlorenchym hin aus, und 16 bis 18 Tagen nach der Infektion füllen die Hyphen die Hohlräume der Stomata und die Bildung von Perithezien wird initiiert. Diese Perithezien überdauern auf den Ernterückständen, reifen und generieren das Inokulum für die nächste Saison.

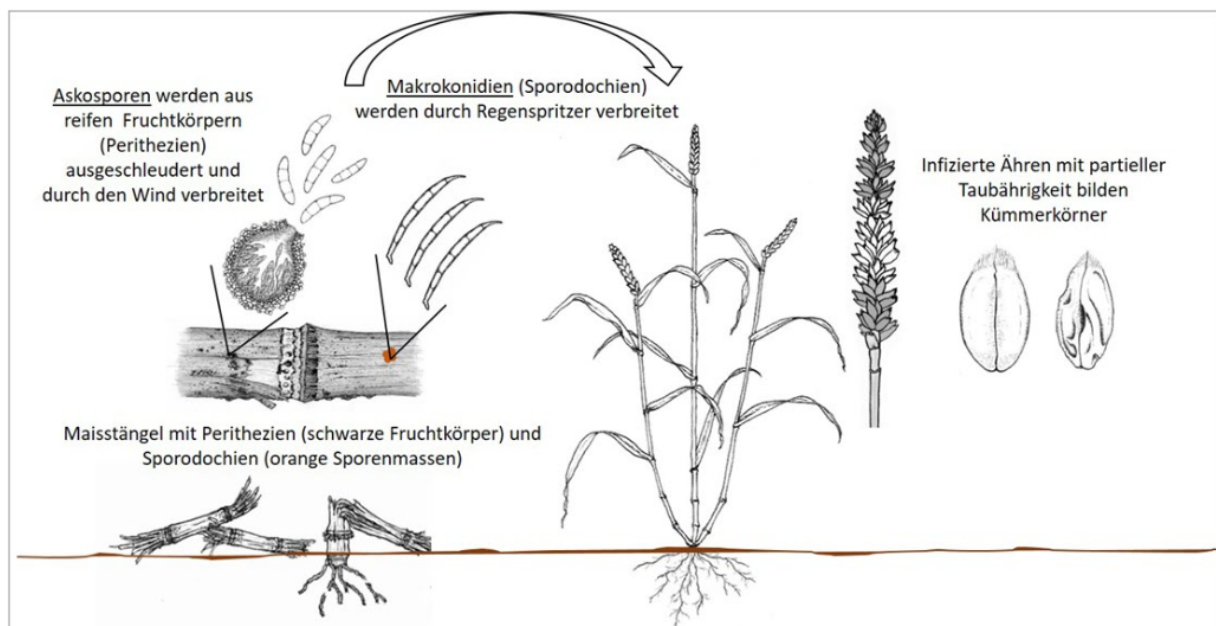


Abbildung 1: Schema des Lebenszyklus von *Fusarium graminearum*.

Quelle: www.agroscope.admin.ch.

Betrachtet man die Symptomatik von FHB auf Weizenähren makroskopisch, so sind die ersten Symptome nach drei bis vier Tagen unter infektionsfördernden Bedingungen, in Form von 2-3 mm schmalen braunen Flecken auf den Spelzen zu beobachten. Diese breiten sich dann zunehmend in alle Richtungen aus (Bushnell et al. 2003; Goswami and Kistler 2004). Mit voranschreitender Infektion stirbt das Ährchen schließlich ab, vertrocknet und bleicht aus. Die Infektion breitet sich in die Spindel und die benachbarten Ährchen aus, wodurch es oftmals zum kompletten Absterben des oberen Teils der Ähre kommt. Letzteres geschieht aufgrund der Tatsache, dass die voranschreitende Infektion die

Wasser- und Nährstoffversorgung in die oberen Teile der Ähre unterbricht. Auf diese Art und Weise entsteht das für eine Infektion mit *F. graminearum* so typische Symptombild der partiellen Weißährigkeit. Je nach Wetterbedingungen kann flaumiges, pink bis rotes Myzel aus den Spelzen heraustreten (Parry et al. 1995; Atanasoff 1920). Zu späteren Infektionszeitpunkten können schließlich Sporodochien oder Perithezien sichtbar werden (Bushnell et al. 2003).

2.2.3 Die Produktion pilzlicher Sekundärmetabolite durch *F. graminearum*

Neben den überlebensnotwendigen Primärmetaboliten wie z.B. Kohlenhydraten, Lipiden und Aminosäuren produzieren Pilze auch die sogenannten Sekundärmetabolite. Diese sind oftmals charakteristisch für bestimmte Arten bzw. Gattungen und werden zudem oft nur während bestimmter Entwicklungsstadien, in bestimmten Gewebetypen oder unter bestimmten Umweltbedingungen synthetisiert (Watson et al. 1999; Collemare et al. 2008; Tominaga et al. 2006; Nutzmann et al. 2011). Mehr als die Hälfte der zwischen 1993 und 2001 isolierten und charakterisierten 1500 Sekundärmetabolite weisen antibakterielle, antifungale oder antitumorale Aktivität auf (Pelaez 2004). Eine Klassifizierung der Sekundärmetabolite kann u. a. nach den für ihre Biosynthese benötigten Enzymklassen erfolgen, in welchem Fall die Polyketide die größte Klasse an Sekundärmetaboliten darstellen. Polyketidsynthasen (PKS) ähneln den eukaryotischen Fettsäuresynthetasen und bestehen aus mehreren unterschiedlichen Domänen. Die Diversität der pilzlichen Polyketidstrukturen hängt nicht ausschließlich von den unterschiedlichen PKS, sondern zusätzlich von den vielen sich daran anschließenden Syntheseschritten ab. Zum Beispiel werden im Falle der Sterigmatocystinsynthese zusätzlich zur PKS fünf Monooxygenasen, vier Dehydrogenasen, eine Esterase, eine O-Methyltransferase, eine Reduktase und eine Oxidase benötigt. Neben den Polyketiden gibt es die Klassen der nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPSs), der Terpene (TPS) und der Indolalkaloide (DMATS).

Bei den sogenannten NRPS handelt es sich um modular aufgebaute Enzyme, die ebenfalls aus mehreren Domänen bestehen (Keller et al. 2005). Die erste identifizierte pilzliche NRPS katalysiert den ersten Schritt in der Biosynthese des β -Lactam Antibiotikums Penicillin (Smith et al. 1990). Terpene, wie z.B. die Trichothecene bestehen aus mehreren Isopren-Einheiten. Das entscheidende Enzym bei der Terpen Synthese stellen die Terpensynthasen dar. Die Terpene umfassen die Monoterpene, die Sesquiterpene, die Diterpene und die Carotinoide. Interessant ist, dass *F. graminearum* über keine DMATS verfügt (Sieber et al. 2014; Niehaus et al. 2016).

Gene, die für ein bestimmtes Sekundärmetabolit kodieren, befinden sich oftmals in enger räumlicher Nähe zueinander, was als sogenanntes *Clustern* bezeichnet wird (Keller et al. 2005; Brown et al. 1996). Pilzliche Sekundärmetabolitgencluster (SMC) sind oftmals Spezies spezifisch (Cary and Ehrlich 2006;

Khalidi et al. 2008; Proctor et al. 2009). *F. graminearum* verfügt über 69 SMC (Sieber et al. 2014; King et al. 2015). Einige dieser sekundären Stoffwechselprodukte, wie die zu den Sesquiterpen-Verbindungen gehörenden Typ-B-Trichothecene, werden aufgrund ihrer toxischen Wirkung gegenüber anderen Organismen auch als Mykotoxine bezeichnet. Typ-B-Trichothecene wie Nivalenol (NIV), Deoxynivalenol (DON) und deren Derivate (4-ANIV, 4,15-diANIV, 3-ADON, 15-ADON, 3,15-diADON) sind entweder am C-3-, C-4- oder am C-15-Atom acetyliert, weshalb bei Isolaten von *F. graminearum* zwischen den NIV, 3-ADON und 15-ADON Chemotypen unterschieden wird (Alexander et al. 2011). Die Gene, welche für die unterschiedliche Synthese dieser Verbindungen codieren, befinden sich zum größten Teil in dem sogenannten Tri-Gen-Cluster (Kimura et al. 2007; Proctor et al. 2009), wobei es Mutationen in bestimmten Tri-Genen sind, welche die unterschiedlichen Chemotypen festlegen (Abb. 2). Mutationen in den beiden Tri-Genen 7 und 13 sind charakteristisch für und bedingen die DON- und NIV-Chemotypen (Lee et al. 2002). Demgegenüber sind Mutationen im *Tri8* Gen für die Differenzierung zwischen den 3-ADON- und 15-ADON-Chemotypen relevant (Alexander et al. 2011).

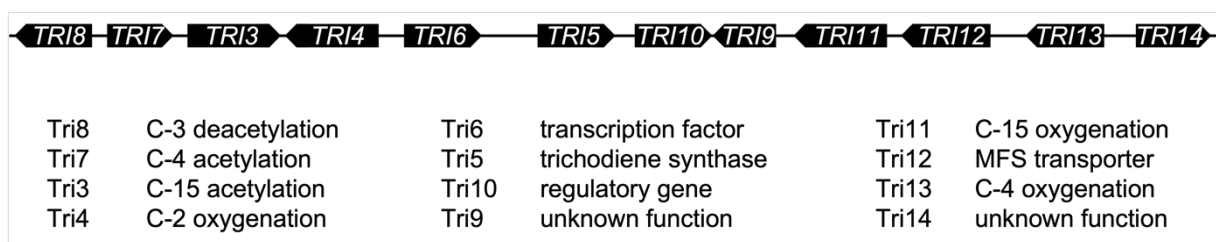


Abbildung 2: Schema des Trichothecen-Genclusters.

Quelle: Rubella et al., 2004, verändert.

Während in Nordamerika über einen großen Zeitraum hinweg der 15-ADON Chemotyp dominierte, zeigte sich in Asien eine andere Chemotypenverteilung. Eine Studie mit 50 verschiedenen japanischen *F. graminearum* Isolaten belegte, dass 70 % dem 3-ADON Chemotyp und die verbleibenden 30 % dem 15-ADON Chemotyp angehörten (Bridges and Gladfelter 2014; Ward et al. 2008; Suga et al. 2008). In europäischen Feldisolaten wurden dagegen alle drei Chemotypen gefunden, wobei der 15-ADON Chemotyp dominierte. Während in Deutschland kaum Isolate mit dem NIV Chemotyp isoliert werden konnten, wiesen in England 25 % der Isolate diesen Chemotyp auf (Talas et al. 2011; Jennings et al. 2004).

Neben der Produktion von Typ-B-Trichothecenen spielt im Zusammenhang mit *F. graminearum* auch die Produktion des Mykotoxins Zearalenon eine wichtige Rolle. Dabei handelt es sich um ein Polyketid, welches östrogene Wirkung zeigt und somit einen negativen Einfluss auf die Reproduktion von Menschen und Tieren hat (Bennett and Klich 2003; Diekman and Green 1992; Ahamed et al. 2001; Prelusky et al. 1990; Mirocha et al. 1981; O'Donnell et al. 2018). Interessanterweise erhöht sich im Organismus die östrogene Wirkung des Polyketids Zearalenon nochmals, indem Zearalenon zu

Zearalenon-Derivaten mit noch stärkerer östrogenen Wirkung reduziert wird (Ueno 1985). Im Vergleich zu Zearalenon verfügen die Typ-B-Trichothecene jedoch über eine höhere akute Toxizität (Foroud and Eudes 2009; Pestka and Smolinski 2005). Bei dem Polyketid Fusarin C handelt es sich neben Zearalenon um ein weiteres Mykotoxin mit östrogenen Wirkung, wobei die Toxizität vergleichbar mit der von Zearalenon ist (Abb. 3). Die für die Synthese von Fusarin C in *F. graminearum* relevanten neun Gene sind zusammen in einem Cluster angeordnet (Brown et al. 2012a; Niehaus et al. 2013). Von zentraler Bedeutung ist hierbei die PKS FgFus1 mit fusioniertem NRPS-Modul (Song et al. 2004; Gaffoor et al. 2005; Rees et al. 2007). Der helix-loop-helix APSES (Asm-1, Phd1, StuA, Efg1 und Sok2) Transkriptionsfaktor StuA ist dagegen in die Synthese von Fusarin C involviert (Rath et al. 2020). Weiterhin beeinflusst der Velvet-Komplex die Biosynthese von Fusarin C (Jackson et al. 1989; Jackson and Freer 1991; Jackson and Lanser 1993; Wiemann et al. 2010). Ebenso beeinflusst dieser Komplex die Biosynthese der Tri-Gene des Trichothecenen-Clusters und die eines weiteren Mykotoxins namens Aurofusarin (Merhej et al. 2012). Bei Aurofusarin handelt es sich um ein Naphthochinon, welches in mit *Fusarium* infizierten Weizenähren nachgewiesen werden konnte und nach Einlagerung in die Zellwand für die typische rote Pigmentierung von *F. graminearum* verantwortlich ist (Kotik and Trufanova 1998; Malz et al. 2005). Deletionsmutanten der Histidinkinase FgOs1, einer Komponente der osmoregulatorischen MAPK-Kaskade, produzieren weniger von diesem roten Pigment (Ochiai et al. 2007). Hauptverantwortlich für die Biosynthese von Aurofusarin sind allerdings 11 Gene, welche in Form eines Clusters angeordnet sind. Die Enzyme, die von diesem Cluster codiert werden, synthetisieren in einem fünf-stufigen Prozess zuerst das Zwischenprodukt Rubrofusarin und schließlich das Polyketid Aurofusarin (Malz et al. 2005; Kim et al. 2005; Frandsen et al. 2006; Kim et al. 2006).

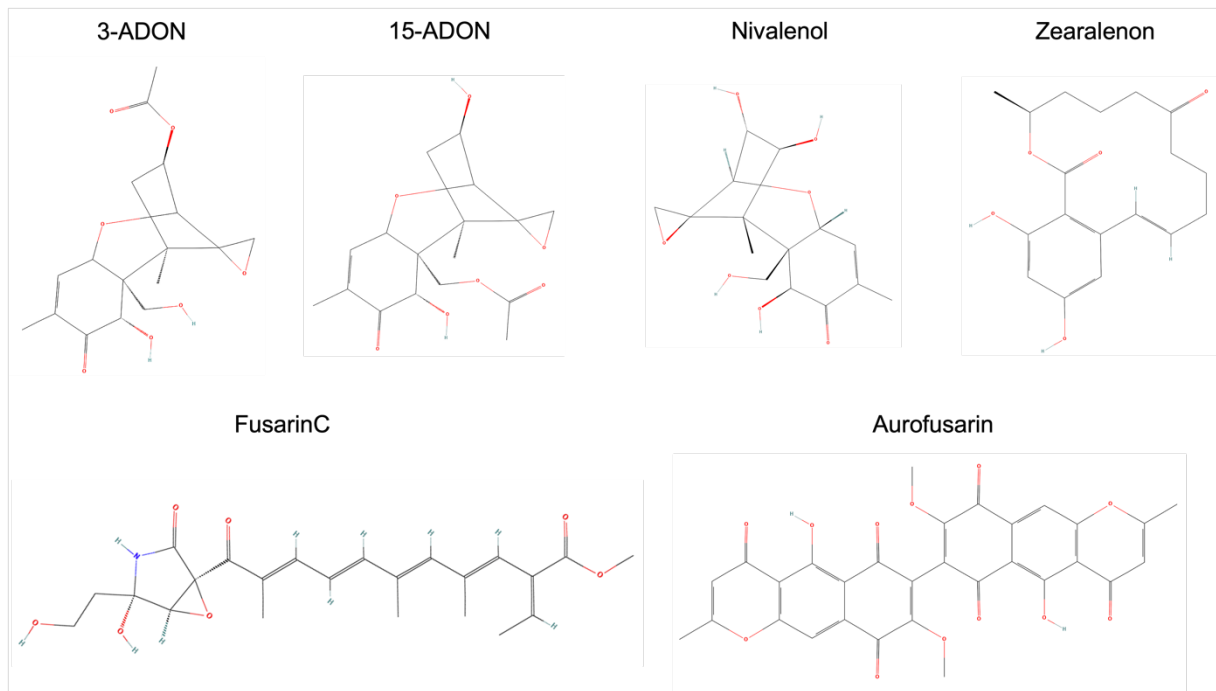


Abbildung 3: Chemische Struktur von 3-ADON, 15-ADON, Nivalenol, Zearalenon, Fusarin C und Aurofusarin.

Quelle: www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov.

Naphthochinone wie Aurofusarin sind zytotoxisch gegenüber bakteriellen, pilzlichen, viralen, pflanzlichen, humanen und tierischen Zellkulturen, verfügen zudem aber auch über entzündungshemmende und antipyretische Eigenschaften (Babula et al. 2009; Medentsev et al. 1990; Medentsev and Akimenko 1998; Jarolim et al. 2018). Die Toxizität wurde auch an Geflügel nachgewiesen, bei denen Aurofusarin die Konzentrationen von Vitamin A, Vitamin E und von Carotinoiden reduziert und so die Anfälligkeit von Lipiden gegenüber dem oxidativen Abbau erhöht (Dvorska et al. 2001, 2002). Zudem konnte gezeigt werden, dass Aurofusarin in Pilzen der Pezizomycotina zur Abwehr von Fressfeinden dient und dass diese die Produktion von Aurofusarin sogar stimulieren (Xu et al. 2019b). Eine Studie an *Trichoderma reesei* unterstützt diese Beobachtung (Atanasova et al. 2013). Während die Produktion von Aurofusarin mit dem vegetativen Wachstum und der Sporenproduktion negativ korreliert, scheint Aurofusarin dagegen keinen Einfluss auf die Virulenz zu haben (Kim et al. 2005; Kim et al. 2006). Hinter der komplexen Regulierung der Aurofusarinbiosynthese stehen mindestens drei Transkriptionsfaktoren, welche sich alle innerhalb des Clusters befinden (*aurR1*, *aurR2* und *aurJ*) (Malz et al. 2005; Frandsen et al. 2006; Kim et al. 2006). Aber auch der Homöobox-Transkriptionsfaktor *FgHtf1*, dessen Gen nicht im Cluster liegt, reguliert neben zahlreichen Genen für die Sporenproduktion und die Chitinsynthese, auch Gene für die Aurofusarinbiosynthese (Fan et al. 2020). Der Transkriptionsfaktor *FgAceA*, welcher in die Kupferentgiftung involviert ist, reguliert die Aurofusarinbiosynthese dagegen negativ. Die Expression von sechs Genen des Aurofusarinclusters ist in Deletionsmutanten dieses Transkriptionsfaktors erhöht, ein Effekt, der durch Zugabe von Kupfer sogar noch gesteigert wird. Interessanterweise senkt die

Zugabe von Kupfer in den Mutanten die Produktion des Typ-B-Trichothecens Deoxynivalenol (Liu et al. 2020), so dass man eine Beziehung zwischen der Produktion von Aurofusarin, Trichothecenen und Zearalenon postulieren kann (Cambaza 2018). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Pks12 Deletionsmutanten von *F. graminearum*, welche kein Aurofusarin bilden, dagegen in der Lage sind, mehr Zearalenon zu produzieren (Malz et al. 2005; Lysøe et al. 2006). Beide Studien gehen davon aus, dass das Unvermögen Aurofusarin zu produzieren indirekt dazu führen könnte, dass die Polyketidvorstufen wie acetyl- und malonyl-CoA in die Synthese anderer Polyketide umgeleitet werden (Malz et al. 2005; Lysøe et al. 2006). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Histon-H3-Lysin-4-Methylierung (H3K4Me) sowohl für die Expression der Gene der Deoxynivalenol- als auch für die der Aurofusarinbiosynthese wichtig ist (Liu et al. 2015b). Auch die beiden Gene FgWc1 und FgWc2, welche den sogenannten „white-collar“ Komplex bilden und ein Schlüsselement in dem lichtabhängigen Reaktionsweg darstellen, beeinflussen die Biosynthese von Trichothecenen und Aurofusarin. In FgWc-Deletionsmutanten ist die lichtunabhängige Biosynthese der beiden genannten Mykotoxine herunterreguliert (Kim et al. 2014).

2.2.4 Durch FHB hervorgerufene Schäden und potenzielle Gegenmaßnahmen

F. graminearum zählt zu den ökonomisch und wissenschaftlich relevantesten Pflanzenpathogen weltweit und belegt damit Platz vier innerhalb der Top 10 der pilzlichen Pflanzenpathogene (Dean et al. 2012). *Fusarium*-Populationen unterliegen einer starken Dynamik, welche durch verschiedene Umweltbedingungen sowie verschiedene Parameter in der agrarischen Praxis beeinflusst wird. Mittlerweile ist z.B. nicht mehr *F. culmorum*, sondern *F. graminearum* die bedeutendste FHB verursachende Spezies in den Niederlanden (Waalwijk et al. 2003), dem Vereinigten Königreich (Jennings et al. 2004) und in Nordeuropa (Yli-Mattila et al. 2009). Aufgrund des gestiegenen Maisanbaus in Nordamerika dominiert nun dort vor allem der NIV-Chemotyp (Carter et al. 2002). Allein zwischen 1991 und 1997 betrug die durch FHB verursachten Verluste für Weizenerzeuger in den USA 1,3 Milliarden US Dollar (Johnson et al. 1998). Innerhalb des gleichen Zeitraums betrug die Verluste der Gerstenerzeuger in den Staaten des Mittleren Westens der USA 200 Millionen US Dollar (Nganje and Johnson 2003). Und auch in den Jahren danach, von 1998 bis 2000, wurden die durch FHB verursachten Verluste der US-amerikanischen Weizen- und Gerstenerzeuger auf 871 Millionen US Dollar geschätzt (Nganje et al. 2004). In Jahren mit besonders starkem Befall wie z.B. 2003, führte FHB in den Südstaaten der USA sogar zu Ertragsverlusten von 30-50 % (Cowger and Sutton 2005). In China betrug die Verluste durch FHB für den Zeitraum von 1950 bis 1990 ebenfalls bis zu 40 % (Wang 1997). Allgemein werden die jährlichen Ertragsverluste durch FHB in China auf eine Millionen Tonnen geschätzt, ein Wert, der sich in Befall starken Jahren auf 2,5 Millionen Tonnen erhöhen kann (Bai and

Shaner 2004; Dubin and Ruckenbauer 1997). Und auch in Deutschland führten eine kühl-feuchte Witterung zum Zeitpunkt der Blüte in den Jahren 1981, 1987, 1991, 1992 und 1998 zu einem starken Auftreten von FHB (Fehrmann and Ahrens 1984; Obst et al. 1990; Muller et al. 1997; Matthies and Buchenauer 2000).

Die Schäden, die durch FHB verursacht werden, sind mannigfaltig. Neben den quantitativen Ertragsverlusten, welche sich auf die Anzahl, die Größe und das Gewicht des Kornes beziehen, sind es vor allem die qualitativen Ertragsverluste, die Schäden hervorrufen (McMullen et al. 1997). So kann eine verringerte Kornqualität in den weiterführenden Produktionszweigen, z.B. in der Backindustrie, zu Problemen führen (Boyacioglu and Hettiarachchy 1995; Nightingale et al. 1999; Wang et al. 2005). Bedeutsamer ist allerdings die bereits erwähnte Gefahr, welche von Mykotoxinen ausgeht. Um sowohl die Ertragsverluste als auch die Kontamination mit Mykotoxinen durch *F. graminearum* auf ein Minimum zu reduzieren, stehen der Landwirtschaft verschiedene Maßnahmen zur Verfügung (Blandino et al. 2012; Salgado et al. 2012; Willyerd et al. 2012). Die Gestaltung der Fruchtfolge und die wendende Bodenbearbeitung stellen hierbei sehr wichtige Maßnahmen zur Bekämpfung dar (Beyer et al. 2006; Dill-Macky and Jones 2000; Pereyra et al. 2004; Pereyra and Dill-Macky 2008; Champeil et al. 2004; Chandelier et al. 2011; Blandino et al. 2010; Koch et al. 2006; Yi et al. 2001). Ebenso von Bedeutung ist der Anbau quantitativ resistenter Sorten, wobei die Resistenz sowohl durch passive Faktoren (morphologische Faktoren), als auch durch aktive physiologische Mechanismen vermittelt werden kann (Koch et al. 2006; Schaafsma et al. 2001). Die Quellen der Resistenzzüchtung sind alte chinesische, japanische und südamerikanische Sommerweizensorten sowie zentral europäische Winterweizensorten (Bai and Shaner 2004; Snijders 1990; Wan et al. 1997). In Zukunft könnte vielleicht auch eine biologische Option zur FHB-Kontrolle zur Verfügung stehen, denn es konnten einige Bakterien und Pilze von Weizen und Mais isoliert werden, welche in der Lage sind, das Aufkommen von FHB im Feld zu reduzieren. Ein *Pseudomonas*-stamm wies in diesem Zusammenhang in ersten Tests eine mehr als 60 %ige Effizienz bzgl. der Reduzierung der Symptomentwicklung von FHB unter Feldbedingungen auf (Schisler et al. 2006). Andere *Pseudomonas*-stämmen führten zu einer 74 – 78 %igen Reduktion der Trichothecegehalte (Khan and Doohan 2009). Aufgrund der allerdings immer noch relativ niedrigen Wirkungsgrade der bisher genannten Maßnahmen, ist der Einsatz von Fungiziden zur Bekämpfung von FHB nach wie vor von entscheidender Bedeutung (Gilbert and Tekauz 2000).

Da aber beispielsweise Strobilurin- und Amin-Fungizide in der Bekämpfung von *F. graminearum* ineffektiv sind und zudem die Anwendung von Strobilurinen zu erhöhten Mykotoxingehalten führen kann, kommt den DMI-Fungiziden eine herausragende Bedeutung zu (Dubos et al. 2011; Liu et al. 2011a; Eiblmeier and von Gleissenthall 2007; Magan et al. 2002; Simpson et al. 2001). Zahlreiche Feldstudien belegten die gute Wirksamkeit der kombinierten Anwendung der beiden DMI-Fungizide

Tebuconazol und Prothioconazol (Mesterhazy et al. 2003; Paul et al. 2008). Metconazol schien unterdessen die Mykotoxinkontamination am zu stärksten zu reduzieren (Paul et al. 2008). Neben den DMI-Fungiziden kommen insbesondere in China Benzimidazol-Fungizide (BMC-Fungizide) zur FHB-Bekämpfung zum Einsatz (Jones 2000; Yin et al. 2009). Beunruhigender Weise mehren sich die Meldungen von Feldisolaten, welche Toleranzen gegenüber DMI- und/oder MBC-Fungiziden zeigen (Klix et al. 2007; Chen and Zhou 2009; Chen et al. 2021; Chen et al. 2019; Yi et al. 2022). Zudem besteht der Verdacht, dass die Verwendung von DMI-Fungiziden zu erhöhten DON-Gehalten führen könnte (Ramirez et al. 2004). Obwohl es sich bei den DMI-Fungiziden um systemische Fungizide handelt, werden die Triazole nicht in ausreichender Menge von den Blättern in die Ähren transportiert. Aus diesem Grund erfolgt die bestmögliche Behandlung zum Zeitpunkt der Blüte, 2-3 Tage vor einer möglichen Infektion durch *F. graminearum* (Mesterhazy et al. 2003; Pirgozliev et al. 2003; Edwards and Godley 2010).

2.3 Die Wirkungsweise von Azol-Fungiziden und Mechanismen der Azol-Resistenzentwicklung

2.3.1 Azol-Fungizide und deren Wirkungsmechanismus auf die Sterolbiosynthese in pilzlichen Membranen

Interessanterweise unterscheiden sich einzelne Schritte der Sterolbiosynthese in Pflanzen, Tieren und Pilzen voneinander. In Pilzen wird Lanosterol in mehreren Schritten über Zymosterol, Fecosterol und Episterol zu Ergosterol umgewandelt (Abb. 4). Sterolbiosyntheseinhibitoren (SBI), wie die Azol-Fungizide unterbinden die für die pilzliche Zellmembran unersetzliche Synthese von Ergosterol und sind demzufolge insbesondere für die Bekämpfung der meisten Asco- und Basidiomyceten geeignet (Poehling and Verreet 2013). Sie bewirken durch die Inhibition der Sterol 14 α -Demethylase die Demethylierung an Position C14 von Lanosterol bzw. 24-Methylendihydrolanosterol (Börner 2009). Die Demethylierung an Position C14 wird durch einen Cytochrom P450 Enzymkomplex katalysiert. Dazu bildet das Eisen im Häm-Teil des Enzyms eine Sauerstoffbrücke zum Lanosterol aus. Die Sauerstoffbrücke kann durch eine Stickstoffbrücke zum Azolring der Azol-Fungizide ersetzt werden. Dadurch wird Lanosterol aus der Bindungstasche verdrängt. Verschiedene Azol-Fungizide passen unterschiedlich gut in diese Enzymtasche. Die Sterol 14- α Demethylase wird durch das Gen *ERG11* codiert, welches in filamentösen Pilzen als *Cyp51* bezeichnet wird (Balding et al. 2008; Poehling and Verreet 2013). Fungizide, die an dieser Stelle angreifen, werden als DMI-Fungizide bezeichnet (De-Methylierungs-Inhibitoren). Mit einem Marktanteil von circa 30 % kommt den DMI-Fungiziden eine der bedeutendsten Rollen in der Bekämpfung pilzlicher Schaderreger zu.

Durch die mangelnde Ergosterolproduktion, sowie die Akkumulation teils toxischer Intermediate werden die Synthese der Membranlipide und somit die Funktion der Membran gestört (Sanglard et al. 2003; Kelly et al. 1995; Pinjon et al. 2003; Chau et al. 2005; Sanglard et al. 2009). So kann der Einbau von 14α -Methylergosta-8,24(28)-dien-3 β ,6 α -diol, eines der toxischen Intermediate, die Fluidität der pilzlichen Membran erhöhen (Abe et al. 2009). Weitere Folgeeffekte betreffen u.a. die Synthese von Fettsäuren und die der Phospholipide (Sanglard et al. 2009). Neben der Wirkstoffgruppe der Triazole gehören die Triazolinthione, die Pyrimidine, die Pyridine, die Piperazine und die Imidazole zu den DMI-Fungiziden (Börner 2009). Die fungizide Wirkung der Triazole wurde von K.H. Buechel entdeckt (Buechel et al. 1975). 1976 erhielt Triadimefon als erstes Triazol-Fungizid die Zulassung. Die Hauptstruktur fast aller Triazole besteht aus einem 1,2,4-Triazol mit einem Substituenten an Position 1. Lediglich Prothioconazol weicht durch ein Schwefelatom in Position 2 von diesem Aufbau ab. Triazole werden über die Blätter und den Spross aufgenommen und systemisch innerhalb der Pflanze verteilt. Die Translokation erfolgt im Apoplasten und akropetal über das Xylem. Triazole wirken sowohl protektiv als auch kurativ und haben ein breites Wirkungsspektrum (Börner 2009).

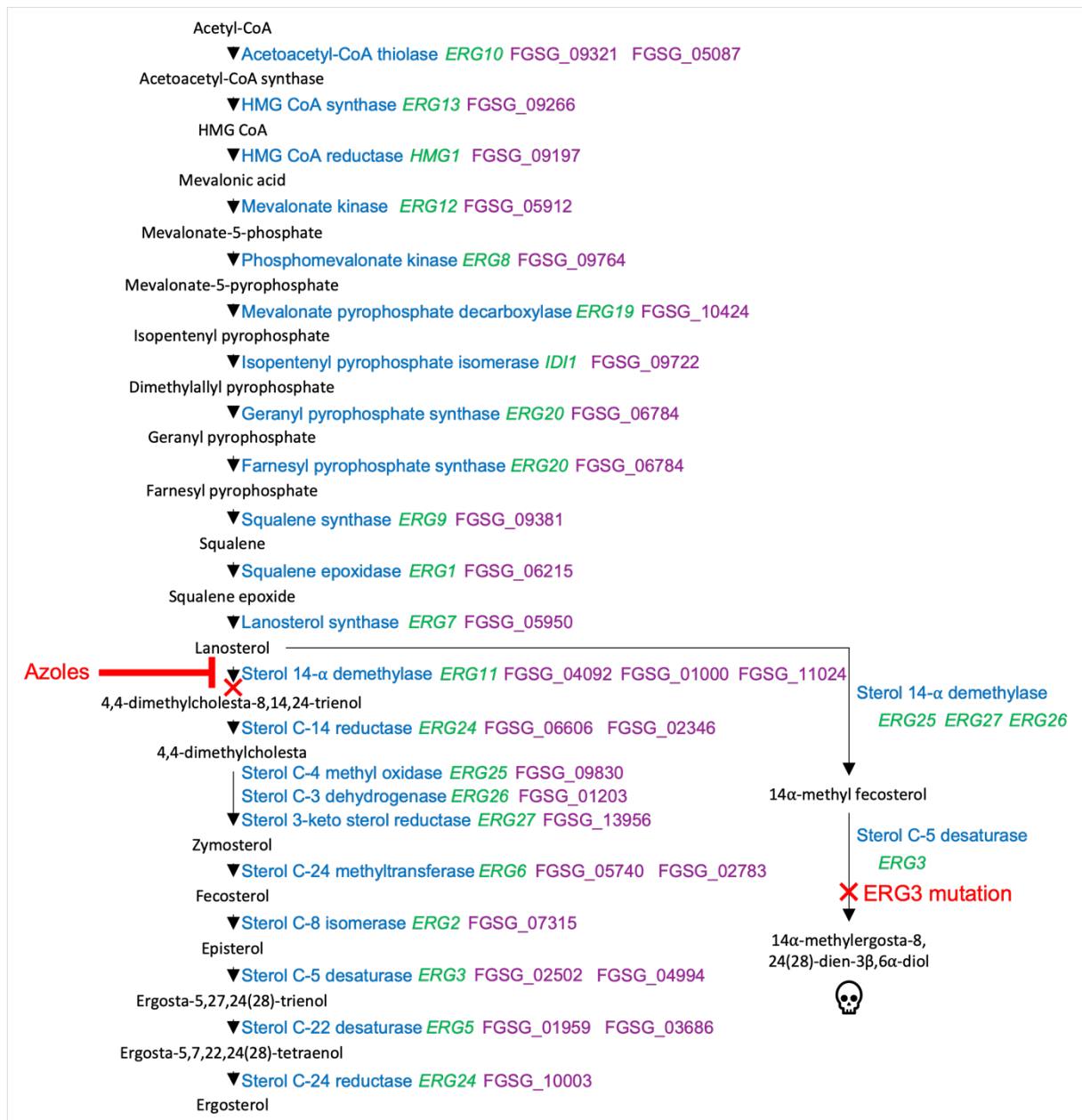


Abbildung 4: Schema der Ergosterolbiosynthese.

Die chemische Verbindung ist in schwarz, das synthetisierende Enzym in blau, das codierende Gen in grün und die *Fusarium graminearum*-Gennummer in violett dargestellt. Quellen: Liu et al., 2019; Chau et al., 2005; Mastel et al. 2010, verändert.

2.3.2 Mechanismen der Resistenzentwicklung gegen Azol-Fungizide

In den meisten Fällen erfolgt die Resistenzentwicklung gegenüber Azol-Fungiziden (Triazole + Imidazole) über einen längeren Zeitraum hinweg und wird zumeist polygenisch vererbt. Die ersten Isolate mit einer reduzierten Sensitivität gegenüber Azol-Fungiziden wurden sieben Jahre nach deren erster Anwendung entdeckt. Isolate, welche diese sogenannte Form der quantitativen Resistenz entwickelt haben, tolerieren im Vergleich zum Rest der Population deutlich höhere

Fungizidkonzentrationen. Im Gegensatz zu einer qualitativen Resistenz, bei der selbst sehr hohe Fungizidkonzentrationen keine Wirkung mehr zeigen, können tolerante Isolate, welche eine quantitative Resistenz aufweisen, hinreichend mit sehr hohen Fungizidkonzentrationen bekämpft werden (Deising et al. 2008). Durch das Ergreifen entsprechender Gegenmaßnahmen (siehe 2.2.4) kann diesem Vorgang entgegengewirkt werden. Nach Informationen des *Fungicide Resistance Action Committee* (FRAC) unterliegen die Wirkstoffe der SBI-I Klasse einem mittleren Resistenzrisiko. Zudem sind Kreuzresistenzen innerhalb dieser Klasse möglich (Börner 2009). Studien belegen, dass Feldpopulationen unterschiedlicher pflanzenpathogener Pilze quantitative Resistenzen gegenüber DMI-Fungiziden ausgebildet haben. Diesen Resistenzen liegen unterschiedliche Mechanismen zugrunde, welche häufig in Kombination auftreten (Hollomon 1993; Yin et al. 2009; Klix et al. 2006; Becher and Wirsel 2012; Lucas et al. 2015).

2.3.2.1 Der Einfluss von Veränderungen am Angriffspunkt auf die Resistenz gegenüber Azol-Fungiziden

Weit verbreitet und gut studiert sind im Zusammenhang mit Azol-Fungizidresistenz Veränderungen am Angriffspunkt der DMI-Fungizide, dem *CYP51* Protein. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass einige pflanzenpathogene Pilze der Gruppe der Pezizomycotina über zwei bzw. drei *CYP51* Gene verfügen. *F. graminearum* weist die drei paralogen Gene *CYP51A*, *CYP51B* und *CYP51C* auf (Becher et al. 2011; Becher and Wirsel 2012). Sowohl für *CYP51A* als auch für *CYP51C* konnte gezeigt werden, dass das Fehlen des jeweiligen Genproduktes die Sensitivität gegenüber DMI-Fungiziden erhöhte (Liu et al. 2011b). In Feldpopulationen spielen vor allem Punktmutationen im offenen Leserahmen („open reading frame“, ORF) bzw. im codierenden Bereich der *CYP51* Gene eine entscheidende Rolle für die Ausprägung der Azol-Toleranz (Becher and Wirsel 2012; Hollomon 1993; Cools et al. 2013; Leroux et al. 2007). Derartige Punktmutationen im *CYP51* Gen wurden sowohl in den Humanpathogenen *Candida albicans* und *Aspergillus fumigatus* (White 1997; Sanglard et al. 1998; Morio et al. 2010; Warrilow et al. 2012; Bellamine et al. 2004; Mellado et al. 2007), als auch in Pflanzenpathogenen wie z.B. *Blumeria graminis*, *Zymoseptoria tritici*, *Penicillium digitatum*, *Pyrenopeziza brassicae*, *Ustilago maydis* und *Venturia inaequalis* identifiziert (Wyand and Brown 2005; Cools et al. 2011; Leroux et al. 2007; Sun et al. 2011; Carter et al. 2014; Joseph-Horne et al. 1995; Kunz et al. 1997). In Abhängigkeit von der Punktmutation im ORF der *CYP51* Gene kann dies die Toleranz gegenüber verschiedenen Azol-Fungiziden in unterschiedlich starkem Maße beeinflussen (Cools et al. 2013). Weniger spezifisch und zumeist weniger drastisch hingegen fällt der durch Insertionen, Duplikationen und Substitutionen hervorgerufene Effekt der Überexprimierung der *CYP51* Gene auf die Toleranz gegenüber den verschiedenen DMI-Fungiziden aus (Cools et al. 2013; Kretschmer et al. 2009; Becher and Wirsel 2012;

Cowen and Steinbach 2008; Selmecki et al. 2006; Mellado et al. 2007; Ghosop et al. 2007; Schnabel and Jones 2001; Kontoyiannis et al. 1999).

2.3.2.2 Der Einfluss von Efflux-Transportern auf die Resistenz gegenüber Azol-Fungiziden

Ein weiterer Resistenzmechanismus besteht darin, die intrazelluläre Fungizidkonzentration niedrig zu halten. Dies kann u.a. durch die Synthese von Fungizid degradierenden Enzymen und/ oder durch Zellwandmodifikationen, welche die Permeabilität der Plasmamembran herabsetzten, erfolgen (Loffler et al. 2000). Von besonderer Bedeutung sind jedoch Efflux-Transporter, welche den fungiziden Wirkstoff aus den Zellen sekretieren (Del Sorbo et al. 2000). Efflux-Transporter sind in zahlreichen zellulären Prozessen involviert und dienen natürlicherweise in Pilzen u. a. für den Export pilzlicher Toxine und aufgenommener toxischer pflanzlicher Substanzen wie Phytoalexinen und Phytoanticipinen (Snyder and Nicholson 1990; Dixon 2001; Hammerschmidt 1999). Darüber hinaus belegen Studien zudem den Einfluss von Efflux-Transportern auf die Resistenz gegenüber Fungiziden (Del Sorbo et al. 2000; Reimann and Deising 2005; de Waard et al. 2006; Becher et al. 2011; Abou Ammar et al. 2013; Goffeau 2008; Monk and Goffeau 2008). Von besonderer Bedeutung sind in diesem Zusammenhang die Plasmamembran lokalisierten *ATP-binding cassette* (ABC) und die *Major facilitator superfamily* (MFS) Transporter. ABC-Transporter nutzen die durch die Hydrolyse von ATP frei gestellte Energie, um strukturell teils sehr unterschiedliche Substrate über die Plasmamembran gegen einen Konzentrationsgradienten hinweg zu transportieren (Del Sorbo et al. 2000; Oldham et al. 2008; Bouige et al. 2002; Holland and Blight 1999; Jones et al. 2009; Coleman and Mylonakis 2009). MFS-Transporter nutzen hingegen die Energie eines Potentialgradienten, um diverse Substrate als Uni-, Sym- und Antiporter über die Plasmamembran hinweg zu transportieren (Del Sorbo et al. 2000; Pao et al. 1998; Saurin et al. 1999). Beispiele von Efflux-Transportern, welche zu der Toleranz gegenüber Fungiziden und antifungalen Substraten beitragen sind von Feld- sowie Laborisolaten u. a. aus *Magnaporthe oryzae*, *Z. tritici*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus nidulans*, *F. graminearum* und *P. digitatum* bekannt (Andrade et al. 2000a; Andrade et al. 2000b; de Waard et al. 2006; Del Sorbo et al. 1997; do Nascimento et al. 2002; Gupta and Chattoo 2008; Nakaune et al. 2002; Stergiopoulos et al. 2003; Zwiers and De Waard 2000; Zwiers et al. 2002; Omrane et al. 2017; Rupp et al. 2017; Sang et al. 2015; Zhao et al. 2022a; Samaras et al. 2020; Xu et al. 2019a; Abou Ammar et al. 2013; Becher and Wirsal 2012; Leroux and Walker 2011). Die Fungizidtoleranz wird in diesen Pflanzenpathogenen durch erhöhte Transkriptgehalte und translationale Aktivierung spezifischer Efflux-Transporter vermittelt. Ein Beispiel hierfür stellt das ABC-Transportergen *ABC1* aus *M. oryzae* dar, dessen Transkription sowohl durch das Phytoalexin Sakuranetin als auch durch Azol-Fungizide induziert wird (Urban et al. 1999). Δ *atr5* ABC-Transportermutanten in *Z. tritici* sind sensitiver gegenüber den pflanzlichen Abwehrsubstanzen

Resorcinol und Resveratrol, wohingegen sich die Δatr Mutanten 1, 2 und 4 als sensitiver gegenüber Azol-Fungiziden zeigen (Zwiers et al. 2003; Zwiers et al. 2002). Auch das ABC-Transportergen *PMR1* aus *P. digitatum* beeinflusst die Toleranz gegenüber Azol-Fungiziden (Nakaune et al. 1998). In *F. graminearum* wurde gezeigt, dass die Einzeldelation der ABC-Transportergene *ABC3* und *ABC4* zu einer Erhöhung der Sensitivität gegenüber Azol-Fungiziden führt. In *Botrytis cinerea* erhöht das MFS-Transportergen *MFS1* die Toleranz gegenüber den beiden natürlichen toxischen Substraten Camptothecin und Cercosporin, sowie gegenüber verschiedenen Fungiziden, einschließlich den Azolen (Hayashi et al. 2003). Diese Beispiele untermalen die Bedeutung pilzlicher Efflux-Transporter für die Resistenz und ggf. Kreuzresistenz gegenüber Fungiziden.

Aus diesen Gründen könnte der Einsatz von Efflux-Transporter-Inhibitoren, in Kombination mit der Gabe von Fungiziden, einen wertvollen Beitrag in der Bekämpfung von Pflanzenpathogen darstellen (Reimann and Deising 2005). In diesem Zusammenhang sind Phytoalexine, wie die Flavonoide einschließlich Hydroxyflavon von Leguminosen, zu nennen. Diese hydrophoben Substanzen assoziieren mit der pflanzlichen Kutikula, inhibieren die Aktivität von Efflux-Transportern und verstärken somit die Wirkung von Fungiziden (Ruiz et al. 1999; Valkama et al. 2004). Am Beispiel von 4'-Hydroxyflavon konnte dies im Zusammenhang mit dem Pflanzenpathogen *Pyrenophora tritici-repentis* gezeigt werden. Die Applikation von 4'-Hydroxyflavon in Kombination mit Fungiziden verhinderte bei Fungizid-toleranten *P. tritici-repentis* Isolaten die Infektion von Weizenblättern (Reimann and Deising 2005). Um Fungizid-resistente Phänotypen zu bekämpfen, wird besonders in der humanmedizinischen Forschung an Efflux-Transporter-Inhibitoren geforscht (van Zuylen et al. 2000; Silva et al. 2013; Nim et al. 2014; Holmes et al. 2012). Weitere Beispiele im Zusammenhang mit der Bekämpfung von Pflanzenpathogenen stellen die Anwendungen von Chlorpromazin und Tacrolimus dar. Beide Substanzen erhöhen die Aktivität von Azol-Fungiziden in *B. cinerea* durch Inhibition von Efflux-Transporter-Aktivität (Hayashi et al. 2003).

2.3.2.3 Der Einfluss von Transkriptionsfaktoren auf die Resistenz gegenüber Azol-Fungiziden

Die transkriptionelle Regulation von Efflux-Transportern und *CYP51* Proteinen ist für die Entwicklung von Azol-Resistenz von großer Bedeutung. Für die Hefen *S. cerevisiae*, *C. albicans* und *C. glabrata* konnte gezeigt werden, dass es sich bei den beiden paralogen Transkriptionsfaktoren, Upc2 und Ecm22, um Regulatoren der Ergosterolbiosynthese handelt. Die beiden Zinkfingertranskriptionsfaktoren aus der Zn₂Cys₆-Familie regulieren im Zellkern u. a. die Biosynthese von *ERG2*, *ERG3* und *ERG11*, indem sie an die Sterol-regulierenden Elemente (SRE) innerhalb deren Promotoren binden (Sanglard et al. 2009; Vik and Rine 2001). Bei einer Soll-Konzentration von Ergosterol sind diese beiden Transkriptionsfaktoren jedoch im Cytoplasma lokalisiert, wo sie mittels

ihrer Liganden-Bindedomäne die Ergosterolkonzentration wahrnehmen. Eine Verminderung der Ergosterolkonzentration führt dazu, dass die beiden Proteine von der Membran in den Zellkern transportiert werden, wo sie an die Promotoren ihrer Zielgene binden (Marie et al. 2008; Yang et al. 2015). Deletionsmutanten von *UPC2* sind deutlich sensitiver gegenüber Azol-Fungiziden und weisen unter Fungizid-Stress im Vergleich zum Wildtyp reduzierte Ergosterolgehalte auf. Die Überexprimierung von *UPC2* erhöht die Resistenz gegenüber Azol-Fungiziden demgegenüber deutlich (Silver et al. 2004; MacPherson et al. 2005). Das gleiche gilt, wenn ein Einzelnukleotidaustausch im *UPC2* Gen zum Aminosäureaustausch G648D führt. Diese sogenannte „Gain of function“-Mutation (*GOF*-Mutation) führt in *C. albicans* zur Hochregulierung von Ergosterolbiosynthesegenen und von *UPC2* selbst (Dunkel et al. 2008). Eine weitere *GOF*-Mutation wurde im *UPC2*-Gen von *S. cerevisiae* gefunden und in Labormutanten von *C. glabrata* nachgestellt. Diese *GOF*-Mutation an Position 898 führt in *C. glabrata* dazu, dass die Zielgene von Upc2^{G898D} unabhängig von einer Fungizidbehandlung, dauerhaft verstärkt exprimiert werden. RNAseq Experimente zeigten, dass zusätzlich zu den bekannten Ergosterolbiosynthesegenen auch solche, mit Bedeutung für die Translation und weitere Membranbiosynthesegene, durch Upc2 reguliert werden (Vu et al. 2021). In beiden Fällen verminderte die *GOF*-Mutation die Vitalität sowie die Virulenz der Isolate (Lohberger et al. 2014). Interessanterweise zeigte sich, dass sich das regulatorische Netzwerk von Upc2 mit dem des Transkriptionsfaktors Pdr1 überschneidet (Vu et al. 2021). Eine genomweite Lokalisationsstudie zeigte, dass Upc2 an 202 Promotoren mit dem Motiv 5'VNCGBDTR'3 bindet und je nach Zielgen und Umgebungsbedingungen sowohl als Aktivator als auch als Repressor fungieren kann. Bei den Zielgenen handelte es sich in dieser Studie u. a. um 12 Ergosterolbiosynthesegene, um 18 Gene, die für ribosomale Proteine kodieren, drei Efflux-Transportergene, vier Transkriptionsfaktorgene und sechs Gene, deren Genprodukte in den Metabolismus schwefelhaltiger Aminosäuren involviert sind. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es sich bei Upc2 um einen globalen Regulator der Lipid- und Membranproteinbiosynthese handelt, der zusätzlich durch die Regulation von Efflux-Transportern die Toleranz gegenüber Azol-Fungiziden beeinflusst (Znaidi et al. 2008).

In dem Erreger der Grünfäule an Zitrusfrüchten, *P. digitatum*, führt die Einzeldelation der beiden Transkriptionsfaktoren SreA und SreB zu reduzierten Ergosterolgehalten, sowie zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber DMI-Fungiziden. Beide Transkriptionsfaktoren gehören zu den sogenannten „sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) welche in den meisten wissenschaftlich erforschten Pilzen als entscheidende Regulatoren der Sterolbiosynthese bekannt sind. Beide Transkriptionsfaktoren weisen die, für die SREBP Transkriptionsfaktoren bekannte, „helix-loop-helix leucine zipper“ DNA-Bindedomäne am N-Terminus auf. Die Deletion dieser Transkriptionsfaktoren in Prochloraz-toleranten Isolaten erhöhte die Sensitivität gegenüber Prochloraz. Außerdem unterblieb die für Prochloraz typische induzierte Expression der Gene Cyp51A und Cyp51B. RNAseq-Analysen

lassen vermuten, dass die beiden Transkriptionsfaktoren zusätzlich Efflux-Transporter regulieren und zur allgemeinen Stressantwort beitragen. Hervorzuheben ist, dass das Fehlen der beiden Transkriptionsfaktoren die Virulenz negativ beeinträchtigt (Liu et al. 2015a; Ruan et al. 2017).

Ähnliches ist auch für den Zinkfingertranskriptionsfaktor AtrR aus *Aspergillus fumigatus* bekannt. Dieser bindet direkt sowohl an den Promotor von *CYP51A*, als auch an den des ABC-Transportergenes *CDRB*. Die Deletionsmutanten sind im vegetativen Wachstum und hinsichtlich ihrer Virulenz inhibiert (Hagiwara et al. 2017). Für *F. graminearum* konnte dagegen gezeigt werden, dass die Ergosterolbiosynthese nicht durch SREBP-Orthologe reguliert wird, sondern durch den Transkriptionsfaktor FgSR. Orthologe dieses Transkriptionsfaktors existieren nur in den Klassen der Sordariomycetes und der Leotiomycetes. FgSR bildet ein Homodimer und bindet an ein 16 Basenpaar kurzes cis-Element im Promotor der Zielgene, welches aus zwei konservierten CGAA-Sequenzen besteht. FgSR wird durch Hog1, phosphoryliert und interagiert dann an den Zielgenen mit dem Chromatin-Remodelierungskomplex SWI/SNF und erhöht auf diese Art und Weise deren Transkription. Des Weiteren zeigen Deletionsmutanten von FgSR Wachstumsdefizite sowie eine reduzierte Virulenz. Letztere wird durch zwei Faktoren verursacht. Zum einen produzieren diese Mutanten weniger des Mykotoxins Deoxynivalenol (DON, siehe 2.2.3), welches für die Ausbreitung des Pilzes innerhalb der Wirtspflanze von Bedeutung ist. Die Transkriptgehalte der für die Biosynthese von DON wichtigen Gene *Tri1*, *Tri6* und *Tri8* sind in den Mutanten reduziert. Auf der anderen Seite reagieren die Δ FgSR-Mutanten sensitiver auf Phytoalexine, welche als Abwehrantwort von Pflanzen auf biotischen Stress produziert werden. Für die Virulenz von *F. graminearum* ist die Degradierung von Phytoalexinen allerdings von entscheidender Bedeutung (Liu et al. 2019).

Die Promotoren der beiden ABC-Transportergene *CDR1* und *CDR2* aus *Candida albicans* und *C. glabrata* weisen fünf typische regulatorische Elemente auf. Für die basale Expression ist das „basal expression element“ (BEE) notwendig, wobei der daran bindende Transkriptionsfaktor noch unbekannt ist. Im Zusammenhang mit Azol-Resistenz ist das „drug-responsive element“ (DRE) wichtig, dass zwei CGG-Triplets enthält, welche durch Zn₂-Cys₆-Transkriptionsfaktoren erkannt werden (Sanglard et al. 2009). Bei Tac1 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, welcher unter Fungizid-Stress an das DRE-Element von *Cdr1* und *Cdr2* bindet und auf diese Weise die beiden ABC-Transportergene transkriptionell aktiviert. Die Deletion von *TAC1* erhöht die Sensitivität gegenüber Azol-Fungiziden, indem die übliche Induktion der beiden genannten ABC-Transporter ausbleibt (Coste et al. 2004). Aus klinischen Isolaten von *C. albicans* sind bisher 16 unterschiedliche *GOF*-Mutationen in Tac1 bekannt, welche zu dessen verstärkter Expression führen. Die Mehrheit dieser *GOF*-Mutationen befindet sich am C-Terminus in der potenziellen Transkriptions-aktivierenden Domäne. Die Einführung dieser Mutationen in Azol-sensitive Isolate führt zur dauerhaften Überexprimierung von *Cdr1* und *Cdr2* und ging mit erhöhter Azol Toleranz einher (Coste et al. 2004; Coste et al. 2007). Interessanterweise

hatte keine dieser Mutationen einen signifikanten Einfluss auf die Virulenz von *C. albicans* (Lohberger et al. 2014). Unter Anwendung von Expressionsanalysen an Azol-resistenten klinischen Isolaten wurde schließlich herausgefunden, dass neben Tac1 selbst, Cdr1 und Cdr2, sowie 28 weitere Gene erhöhte- und 12 Gene erniedrigte Transkriptabundanz aufwies. Chromatin Immunopräzipitation-Chip (ChIP-Chip) Analysen, mit denen Protein-DNA Interaktionen herausgefunden werden können, untermauerten diese Ergebnisse und zeigten, dass Tac1 sowohl an seinen eigenen Promotor bindet als auch an die von *CDR1* und *CDR2*. Darüber hinaus bindet Tac1 an 34 weiteren Promotoren von Genen mit Funktionen in der Mobilisierung und dem Transport von Lipiden, sowie in der Antwort gegenüber oxidativem Stress (Liu et al. 2007).

In dem Erreger der Dollarfleckenkrankheit, *Sclerotinia homoeocarpa*, erhöht eine *GOF*-Mutation in dem Transkriptionsfaktor *XDR1* die Resistenz gegenüber mehreren Fungizidklassen einschließlich Azol-Fungiziden. In diesem Isolat sind sowohl Cytochrom P450 Monooxygenasen, welche in der Lage sind, fungizide Wirkstoffe zu modifizieren, als auch ABC-Transporter überexprimiert. Auch in *B. cinerea* führte die Einführung dieser *GOF*-Mutation in das homologe Gen zu Resistenzen gegenüber mehreren Fungizidklassen, einschließlich Azol-Fungiziden (Sang et al. 2018).

Bei einem weiteren Transkriptionsfaktor namens Pdr1 handelt es sich um den Hauptregulator des sogenannten „pleiotropic drug resistance (PDR)“ Netzwerkes. Die Disruption von *PDR1* in *C. glabrata*, welches homolog zu dem gleichnamigen Gen in *S. cerevisiae* ist, erhöht die Sensitivität gegenüber dem Azol-Fungizid Fluconazol um das 16-fache. Pdr1 reguliert die konstitutive und induzierte Expression u. a. des ABC-Transporters Cdr1, welcher auch durch Tac1 reguliert wird (Tsai et al. 2006). Genomweite Expressionsstudien bestätigten 10, der bereits von Pdr1 und Pdr3 aus *S. cerevisiae* bekannten, differentiell exprimierten Zielgene. Zusätzlich wurden 99 weitere differentiell exprimierte Gene in *C. glabrata* gefunden. Hierbei handelt es sich um Gene mit Transporterfunktion, Zellwandbiosynthesefunktion, Funktionen im Lipidmetabolismus und um Gene, die im Zusammenhang mit Zellstress und DNA-Reparatur stehen (Vermitsky et al. 2006). In einer anderen Veröffentlichung wurde zudem gezeigt, dass auch der ABC-Transporter Snq2 zu der Pdr1 abhängigen Resistenz gegenüber Azol-Fungiziden beiträgt (Torelli et al. 2008). Aus klinischen Isolaten sind zahlreiche *GOF*-Mutationen in *PDR1* von *C. glabrata* bekannt. Diese sind für die konstitutiv hohen Transkriptgehalte einiger ABC-Transportergene, sowie für die von Pdr1 selbst, verantwortlich. Die verschiedenen Mutationen beeinträchtigen die Expression der Zielgene von Pdr1 allerdings unterschiedlich stark (Tsai et al. 2006; Torelli et al. 2008; Tsai et al. 2010).

Neben der transkriptionellen Regulierung der ABC-Transporter spielt auch die der MFS-Transporter im Zusammenhang mit Azol-Resistenz eine wichtige Rolle. Ein Beispiel hierfür stellt der MFS-Transporter Mdr1 („multidrug resistance 1“) von *C. albicans* dar. In Fungizidresistenten Isolaten wird sowohl die basale wie auch die durch Fungizide induzierte Expression von Mdr1 durch den Zinkfinger-

Transkriptionsfaktor Mrr1 („multidrug resistance regulator 1“) reguliert. Sowohl Mrr1 als auch Mdr1 werden unter Fungizid-Stress hochreguliert. Die Inaktivierung des für Mrr1 codierenden Gens führt in resistenten Isolaten zu niedrigeren Transkriptgehalten von *MDR1* und zum Verlust der Fungizidresistenz. Ursache der erhöhten Fungizidresistenz sind demgegenüber *GOF*-Mutationen innerhalb des Mrr1 Transkriptionsfaktors (Morschhäuser et al. 2007). Keine der bisher bekannten *GOF*-Mutationen hat einen signifikanten Effekt auf die Virulenz von *C. albicans* (Lohberger et al. 2014). *GOF*-Mutationen im Mrr1 Transkriptionsfaktor sind auch aus Fungizidresistenten *B. cinerea* Feldisolaten bekannt (Kretschmer et al. 2009). Wie im Fall von Tac1, so sind auch im Fall von Mrr1 die funktionalen Domänen noch immer unbekannt (Morschhäuser et al. 2007). Viele der durch Mrr1 induzierten Gene sind sowohl unter Fungizid-Stress als auch unter H₂O₂ Stress induziert (Enjalbert et al. 2003).

In *A. fumigatus* wird die Überexprimierung von Mdr1 dagegen u. a. durch den Cys₂His₂ Zinkfinger-Transkriptionsfaktor SlrA reguliert, welcher an das AGGCA-Motiv in den Promotoren seiner Zielgene bindet. SlrA reguliert sich selbst und ist u. a. in die Regulierung von Mdr1 und weiterer Efflux-Transporter involviert, reguliert allerdings auch Gene der Ergosterolbiosynthese. Interessanterweise kompensiert die Überexprimierung von Erg11A oder Mdr1 den Azol-sensitiven Phänotyp der SlrA Deletionsmutante. Die Transkriptgehalte von Erg11A und Mdr1 sind in den Deletionsmutanten allerdings nur um 50 % reduziert. Grund dafür ist die Co-Regulation durch weitere Transkriptionsfaktoren. Dabei wird die Expression von Mdr1 zusätzlich durch CrzA und die Expression von Erg11 zusätzlich durch SrbA und AtrR reguliert (Du et al. 2021).

Ein weiterer Transkriptionsfaktor namens Yap1, reguliert in *Alternaria alternata* den MFS-Transporter MFS54. Deletionsmutanten dieses Transporters zeigen deutliche Vitalitätsdefizite, sind sensitiver gegenüber Fungiziden und schwächer virulent (Lin et al. 2018). In *C. glabrata* reguliert YAP1 ebenfalls das Mdr1-Homolog Flr1 (Alarco et al. 1997). Von den bisher genannten Transkriptionsfaktoren regulieren in Hefen vor allem Upc2, Pdr1, Tac1 und Mrr1 die wichtigsten Gene in Zusammenhang mit Azol-Fungizidresistenz. Es ist allerdings bekannt, dass die Expression der bereits genannten Efflux-Transporter durch weitere Transkriptionsfaktoren moduliert werden kann. In *C. albicans* ist der Transkriptionsfaktor Ndt80 u.a. für die Expression der Ergosterolbiosynthesegene und der von Efflux-Transportern wie z.B. Mdr1 wichtig. Für den ABC-Transporter Cdr1 ist Ndt80 ein positiver Regulator. Die Inaktivierung von Ndt80 verringert sowohl die Basistranskriptgehalte von Cdr1 als auch die Induzierbarkeit von Cdr1 unter Fungizid-Stress (Chen et al. 2004). Bei dem Transkriptionsfaktor Rep1 („regulator of efflux pump 1“) handelt es sich dagegen um ein Beispiel für einen negativen Regulator für Mdr1, da die Deletion von *REP1* die Sensitivität gegenüber Fungiziden verringert und die Expression von *MDR1* unter Fungizid-Stress erhöht. Sogar in Abwesenheit von Rep1 und Mrr1 kann *Mdr1* unter Fungizid-Stress transkriptionell aktiviert werden, was darauf hindeutet, dass weitere regulatorische Faktoren involviert sind (Chen et al. 2009).

Transkriptionsfaktoren sind in Eukaryoten zusammen mit den DNA-bindenden Proteinen und der RNA Polymerasemaschinerie Teil eines Komplexes, welcher für die Transkription unersetzlich ist. Um die Transkriptionsmaschinerie zu rekrutieren, kooperieren Transkriptionsfaktoren z.B. mit Coaktivatoren wie Ada2, welcher Teil des sogenannten Spt-Ada-Gcn5 Histon Acetyl-Transferase (SAGA) Coaktivatorkomplexes ist, welcher die Histonacetylierung koordiniert (Sanglard et al. 2009). Ada2 wird durch Mrr1 zu dem Promotor von *MDR1* rekrutiert und kann auch an den Promotor von *CDR1* binden, wobei der für diese Rekrutierung verantwortliche Transkriptionsfaktor nach wie vor unbekannt ist (Sellam et al. 2009). Der SAGA Coaktivatorkomplex kann auch mit dem Mediator Komplex assoziieren, dessen Hauptaufgabe es ist, die Signale von den Transkriptionsfaktoren zu den Polymerasen weiterzuleiten (Allen and Taatjes 2015; Nishikawa et al. 2016). Studien in *S. cerevisiae* und *C. glabrata* haben gezeigt, dass Gal11, eine Untereinheit des Mediator Komplexes, an Pdr1 bindet. Fungizid-Stress stimuliert diese Assoziation von Pdr1 mit Gal11, rekrutiert auf diese Weise den Mediator Komplex und führt zu einer Erhöhung der Transkriptabundanz der Zielgene von Pdr1 (Thakur et al. 2008).

Die Produktion von Sekundärmetaboliten (SM) ist für Pilze essenziell, um die Wirtspflanzen erfolgreich infizieren zu können. Die meisten Sekundärmetabolitcluster (SMC) werden allerdings nur unter ganz bestimmten Umweltbedingungen angeschaltet. Tri6 ist ein globaler Cys₂His₂ Zinkfingertranskriptionsfaktor, welcher in *F. graminearum* positiv die Expression der Gene *TRI1*, *TRI3*, *TRI6*, *TRI7*, *TRI12* und *TRI14* reguliert und somit gezielt die Biosynthese des Sekundärmetabolits DON steuert (siehe 2.2.3). Chromatin Immunoprecipitation-Sequenzierungs (ChIP-Seq) Analysen zeigten, dass Tri6 zudem 192 weitere potenzielle Zielgene reguliert. So interagiert Tri6 z. B. auch mit dem Transkriptionsfaktorgen *GRA2* und steuert somit indirekt den Gramillin Gencluster (Nasmith et al. 2011; Shostak et al. 2020). Auch der Transkriptionsfaktor StuA aus *F. graminearum* ist in die Produktion von Sekundärmetaboliten involviert. Deletionsmutanten von StuA produzieren signifikant weniger Sporen und sind deutlich schwächer virulent (Lysøe et al. 2011). Ebenso spielt in *A. flavus* der APSES Transkriptionsfaktor StuA, zusammen mit RafA, eine zentrale Rolle in der Biosynthese von Sekundärmetaboliten. Dies bezieht sich in besonderem Maße auf die Produktion von Aflatoxin und Cyclopiazonsäure. Die Deletionsmutanten sind weniger virulent und zeigen Defekte hinsichtlich der Sporenproduktion (Yao et al. 2017). Ähnliches gilt auch für den Zn₂-Cys₆ Transkriptionsfaktor AtrR aus *F. graminearum*. AtrR Deletionsmutanten produzieren ebenfalls weniger Sporen und sind signifikant schwächer virulent. Zusätzlich zeigen sie ein beschleunigtes radiales Wachstum mit Pigmentierungsproblemen, eine reduzierte DON-Produktion sowie eine verringerte Toleranz gegenüber Azol-Fungiziden. RNAseq Analysen zeigten, dass AtrR viele metabolische Stoffwechselwege beeinflusst und auch das *CYP51A* Gen sowie ABC-Transportergene reguliert (Zhao et al. 2022b).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass besonders die transkriptionelle Regulation von Efflux-Transportern, Sekundärmetabolitclustern, Cytochrom P450 Monooxygenasen und weiteren Ergosterolbiosyntheseegenen im Zusammenhang mit Azol Toleranz von großer Bedeutung ist. Dazu regulieren sich viele der in diesem Zusammenhang stehenden Transkriptionsfaktoren selbst. Interessant ist zudem, dass einige Transkriptionsfaktoren sowohl als Aktivatoren, als auch als Repressoren fungieren können. Während die Deletion dieser Transkriptionsfaktoren die Sensitivität gegenüber Azol-Fungiziden oftmals erhöht, führen *GOF*-Mutationen dagegen häufig zu einer Erhöhung der Azol Toleranz. *GOF*-Mutationen gehen wiederum oft mit einer verminderten Virulenz und/ oder Vitalität einher.

2.4 Zielstellung

In der Bekämpfung von *F. graminearum* kommt vor allem den Azol-Fungiziden und an vorderster Stelle Tebuconazol und Prothioconazol eine wichtige Stellung zu. Jedoch belegen zahlreiche Azol-resistente Feldisolat die sich zuspitzende Gefahr einer weiter zunehmenden Resistenzentwicklung gegenüber Azol-Fungiziden. Aus diesem Grund ist es von elementarer Bedeutung das Verständnis über die, der Azol-Resistenz zugrundeliegenden Mechanismen zu erweitern. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Azol-Resistenz auch unter Laborbedingungen induzierbar ist (Becher et al. 2010). Aus *in vitro* Adaptionsexperimenten hervorgegangene Azol tolerante Isolate wurden zusammen mit dem Fungizid-sensitiven Ursprungsisolat Genom-sequenziert, wobei mehrere Einzelnukleotidpolymorphismen identifiziert wurden.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es im Detail herauszufinden, welche dieser Einzelnukleotid-austausche (SNPs) Azol-Resistenz vermitteln und welche Mechanismen dieser Resistenz zugrunde liegen. Die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Mutanten und Transformaten werden hierzu im Vergleich zu den Referenzisolaten charakterisiert. Fungizidversuche prüfen, ob ein einziger SNP innerhalb eines bisher unbekanntes Transkriptionsfaktorgens dazu in der Lage ist, Azol-Resistenz in *F. graminearum* zu vermitteln. Versuche zur Vitalität, Virulenz und Mykotoxinproduktion transgener Stämme, sollen aufklären, ob der SNP innerhalb des bisher unbekanntes Transkriptionsfaktorgens für den Pilz von Nachteil ist. Zusätzlich liefern genomweite Transkriptomanalysen Informationen über die der Azol-Resistenz zugrundeliegende Komplexität der transkriptionellen Regulation.

3 Material und Methoden

3.1 Biologisches Material

3.1.1 *Fusarium graminearum*

3.1.1.1 Verwendete Stämme

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde das Wildtypisolat *F. graminearum* NRRL 13383 als Referenzisolat sowie als Ausgangsisolat für die durchgeführten Transformationen verwendet. Es wurde ursprünglich von einem infizierten Maiskolben aus dem Iran isoliert und bildet das Typ B Trichothecen Nivalenol (NIV). Innerhalb des *F. graminearum* Spezies Komplexes gehört dieses Isolat der Abstammungslinie 7 an, die als *Fusarium graminearum sensu stricto* bezeichnet wird (O'Donnell et al. 2000; O'Donnell et al. 2004). Es handelt sich um ein hoch infektiöses Isolat gegenüber Weizen (Goswami and Kistler 2004). Zudem wurde das Azol-tolerante Isolat P1-11 als weiteres Referenzisolat verwendet (Becher et al. 2010). Nach Bestätigung des richtigen Integrationsereignisses bei den Transformanten wurden pro Transformationskonstrukt zwei unabhängige Transformanten für die in dieser Arbeit gezeigten Experimente verwendet.

3.1.1.2 Kultivierung und Lagerung

Die Makrokonidien der verwendeten Isolate werden bei -70 °C als Dauerkulturen in 35 %-igem (v/v) Glycerin gelagert. Für Experimente wurden SNA-Agar-Petrischalen (siehe 8.4.1) aus diesen Dauerkulturen angeimpft und bei 25 °C im Dunkeln inkubiert. Die Petrischalen mit einem Durchmesser von 85 mm enthielten 30 ml Medium. Diese Vorkulturen erreichten meist in fünf Tagen den Rand der Petrischale und dienten als Inokulum für die darauffolgenden Versuche. Bei Antibiotikum-resistenten Transformanten wurde dem SNA-Medium das entsprechende Antibiotikum in einer Konzentration von 100 µg/ml zugesetzt (siehe 8.4.2).

Zur Gewinnung von Makrokonidien wurden ausgehend von den SNA-Petrischalen 100 ml Mungobohnen Flüssigmedium (siehe 8.4.1) in einem 300 ml Erlenmeyer-Weithalskolben mit fünf Myzelstückchen angeimpft und anschließend bei 23 °C und 125 rpm in einem Inkubationsschüttler (Infors HT Multitron Standard, CH) im Dunkeln inkubiert. Nach fünf bis sieben Tagen wurde die Kultur durch autoklaviertes Miracloth-Gewebe (Merck KGaA, Darmstadt, DE) abfiltriert. Das hauptsächlich Makrokonidien enthaltende Filtrat wurde bei 3500 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 500 µl H₂O_{Bidest} aufgenommen und auf Eis gelagert. Die Zelldichte wurde mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer (LO-Laboroptik, Friedrichsdorf, DE) bestimmt. Soweit nicht anders angegeben,

wurden diese Suspensionen auf 1×10^6 Konidien/ml eingestellt. Die Sporen wurden immer vor dem jeweiligen Experiment am gleichen Tag geerntet.

3.1.2 *Escherichia coli*

3.1.2.1 Verwendete Stämme

Die beiden *E. coli*-Stämme, NEB 5-alpha (New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, DE) und X-L1-Blue (Stratagene, Heidelberg, DE) wurden für die Transformationen und zur Vermehrung von Plasmiden verwendet. Die chemisch kompetenten Zellen des Stammes NEB 5-alpha wurden käuflich erworben. Chemisch kompetente Zellen von X-L1-Blue wurden nach dem Protokoll von Chung et al. (1989) hergestellt.

3.1.2.2 Kultivierung und Lagerung

Um chemisch kompetente X-L1-Blue Zellen herzustellen (Chung et al. 1989), wurden 400 µl einer Übernachtskultur in 50 ml LB-Medium (siehe 8.4.1) überführt und bis zu einer OD_{600} von 0,3 - 0,5 bei 37 °C und 200 rpm im Kulturschüttler (Infors HT Multitron Standard, CH) inkubiert.

Die Zellen wurden bei 1000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und in 5 ml eiskalter *Transformation and Storage-Solution* (TSS-Lösung) (siehe 8.4.2) resuspendiert. Aliquots von jeweils 100 µl wurden bei -70 °C eingefroren oder direkt für eine Transformation genutzt (siehe 3.2.4.3).

E. coli Stämme mit Plasmiden für Ampicillin-Resistenz wurden entweder auf LB_{amp}-Agar-Petrischalen bei 37 °C im Inkubationsschrank, oder in LB_{amp}-Flüssigmedium bei 37 °C und 200 rpm im Kulturschüttler kultiviert. Das LB-Flüssigmedium wurde jeweils mit einer Einzelkolonie angeimpft.

3.1.3 Pflanzen

3.1.3.1 Verwendete Sorten

Für die Infektionsexperimente wurde die Weizen Sorte Sonett (Lantmännen Lantbruk, Svalöv, Schweden) verwendet. Bei dieser Sorte handelt es sich um einen seit 2010 zugelassenen Sommerweichweizen der E-Qualitätsgruppe mit der Kennnummer 900. Die Anfälligkeit gegenüber Ährenfusarien wird vom Bundessortenamt als mittel bis stark angegeben (Note 6). Die Samen waren nicht gebeizt. Die Infektion von Mais wurden mit der Sorte Golden Jubilee (Territorial Seed Company, Cottage Grove, OR, USA) durchgeführt.

3.1.3.2 Anzuchtbedingungen

Zehn Weizensamen wurden in Rundtöpfen (\varnothing 14 cm) in Einheitserde (Classic Profi Substrat; Einheitserde GmbH & Co. KG, Sinntal-Altengronau, Uetersen, Fröndenberg, DE) ausgesät und sieben Tage nach Aufgang auf fünf Pflanzen pro Topf vereinzelt. Um ein Umknicken der Pflanzen zu verhindern und die Handhabung beim wöchentlichen Randomisieren zu erleichtern, wurde auf jeden Topf eine Pflanzenstütze aufgesetzt. Als Langzeitdünger wurde pro Topf nach fünf Tagen eine PLANTOSAN™ COMPACT 4 g Tablette verwendet. Dieser NPK-Dünger (15-8-15) enthält zusätzlich 2 % Magnesium, 0,02 % Bor, 0,05 % Kupfer, 0,1 % Eisen, 0,075 % Mangan, 0,015 % Molybdän und 0,015 % Zink (AGLUKON Spezialdünger GmbH & Co. KG, Düsseldorf, DE). Die Pflanzen wurden tagsüber bei 25 °C (\pm 2 °C) und einem Lichtflux von 35000 Lumen (Natriumdampflampen Plantastar 600 Watt E40/ES Lampen; Osram, München, DE) kultiviert. Die Nachttemperatur betrug 20 °C (\pm 2 °C). Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug 16 h/8 h (Langtagbedingungen), die relative Luftfeuchtigkeit (RH) lag bei 50 %. Nach sieben bis acht Wochen im Gewächshaus erfolgte die Inokulation (siehe 3.4), und die inokulierten Pflanzen wurden bei 25 °C und 75 % RH in Anzuchtschränke (Percival Scientific AR-75HIL; Percival Scientific Inc., Perry, Iowa) gestellt. Während der ersten drei Tage erfolgte die Inkubation zusätzlich in Folienkabinetten (420 x 610 x 1220 mm BxTxH) auf gefüllten Wasserschalen bei nahezu 100 % RH. Für die Beleuchtungsdauer von 16 h wurde die Lichtintensität auf 200 μ E/m²/s eingestellt, gemessen auf Höhe des Topfrandes.

Maispflanzen wurden für fünf bis sechs Wochen im Gewächshaus kultiviert. Dazu wurden pro Rundtopf (\varnothing 10 cm) vier Samen in Einheitserde (Classic Profi Substrat Einheitserde GmbH & Co. KG, Sinntal-Altengronau, Uetersen, Fröndenberg, DE) ausgesät und nach dem Aufgang der Pflanzen auf eine Pflanze pro Topf vereinzelt. Die in den Gewächshauskabinen eingestellten Parameter entsprachen denen für Weizen. Die Pflanzen wurden nach der zweiten, vierten und sechsten Woche mit je 30 ml verdünntem Flüssigdünger pro Topf gedüngt (TIP Flüssigdünger, NPK-Dünger, Goldhand Vertriebsgesellschaft, Düsseldorf, DE; 20 L Wasser + 40 ml Dünger). Nach der Inokulation verbrachten die Pflanzen zehn weitere Tage unter diesen Bedingungen im Gewächshaus.

Weizen- wie Maispflanzen wurden gegossen, sobald die Erde im Topf oberflächlich abgetrocknet war und einmal pro Woche wurden die Positionen aller Töpfe randomisiert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Präparation von Nukleinsäuren

3.2.1.1 Präparation von genomischer DNA aus *F. graminearum*

3.2.1.1.1 Mini-Präparation

Die folgende Methode wurde für die Isolierung von genomischer DNA (gDNA) aus *F. graminearum* für den Einsatz in Test-PCRs angewendet. Zu diesem Zweck wurde etwas Luftmyzel mit einem sterilen Zahnstocher von einer bewachsenen PDA-Petrischale in ein 2 ml Mikroreaktionsgefäß überführt, in welchem bereits 1 ml PD-Medium vorlag. Nach einer Inkubation von mindestens drei Tagen bei Raumtemperatur (RT) und 50 rpm wurde bei 17000 x g und RT für 5 min zentrifugiert und im Anschluss der Überstand verworfen. Zum Sediment wurden 800 µl *Breaking Buffer* und zwei sterile Stahlkugeln (ø 2 mm) zugegeben. Das Myzel wurde dann in einer Schwingmühle (MM 400, Retsch, Haan, DE) bei 30 Hertz für 1 min fragmentiert. Anschließend wurden je Mikroreaktionsgefäß 800 µl Roti-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) zugegeben und auf der höchsten Stufe für 10 sec auf einem Vortexer gemischt. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 4 °C und 13000 x g für 20 min. Die obere Phase wurde jeweils in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt, in welchem bereits 750 µl Isopropanol (auf 4 °C vorgekühlt) vorgelegt waren. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 4 °C. Danach wurde die DNA durch Zentrifugation gefällt (4 °C, 13000 x g, 20 min). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation von 5 min wurde der Überstand verworfen, das Mikroreaktionsgefäße zum Trocknen unter eine Sterilbank gestellt und das Sediment in 50 µl H₂O_{Bidest} resuspendiert.

3.2.1.1.2 Maxi-Präparation

Mit dieser Methode war es möglich, gDNA von höherer Qualität zu isolieren. Zu diesem Zweck wurden 100 ml PD-Medium mit fünf Myzelstückchen von einer SNA-Petrischale angeimpft und bei 23 °C und 50 rpm für fünf Tage inkubiert. Anschließend wurde der Kulturüberstand mit Hilfe eines Kaffeefilters abfiltriert, das so erhaltene Myzel wurde dann zwischen saugfähigem Papier trocken gepresst, in Alufolie verpackt und bei -20 °C gelagert. Etwa 500 mg Myzel wurden in flüssigem Stickstoff in einem Mörser zermahlen, das erhaltene Pulver wurde in ein 2 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und 800 µl Extraktionspuffer I hinzugegeben. Nach dem Mischen per Hand wurden 800 µl Roti-Phenol/Chloroform (1:1; 4 °C) zugefügt und die Mikroreaktionsgefäße erneut gemischt. Nach der Zentrifugation (4 °C, 14.500 x g, 10 min) wurde die obere wässrige Phase in ein neues 2 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und 800 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1; 4 °C) zugegeben. Nach Mischung der Ansätze durch

Invertieren und Zentrifugation (10 min, 4 °C, 14.500 x g), wurde die obere wässrige Phase in ein neues 2 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und mit 800 µl Isopropanol (4 °C) versetzt. Die Mikroreaktionsgefäße wurden vorsichtig invertiert und für 1 h bei -20°C inkubiert. Die DNA wurde schließlich durch Zentrifugation (4 °C, 6800 x g, 15 min) gefällt, die wässrige Phase abgezogen und verworfen. Das Sediment wurde in 700 µl Extraktionspuffer II (siehe 8.4.2) aufgenommen. Nach Zugabe von 3,5 µl RNase A (10 mg/ml) erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C und eine weitere für 2 min auf Eis. Nun wurden 17,5 µl 20 % (w/v) SDS zugegeben und die Gefäße invertiert. Anschließend wurden 10 µl Proteinase K zugesetzt und für 1 h bei 60 °C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 800 µl Roti-Phenol Chloroform (1:1; 4 °C). Nachdem die Mikroreaktionsgefäße invertiert und zentrifugiert wurden (4 °C, 14500 x g, 20 min), wurde die obere Phase erneut in ein 2 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und 800 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1; 4 °C) zugegeben und für 10 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und 800 µl Isopropanol (4 °C) zugegeben. Die Mikroreaktionsgefäße wurden erneut invertiert und zentrifugiert (4 °C, 14.500 x g, 20 min), der Überstand anschließend verworfen und das Sediment in 500 µl 70 % (v/v) Ethanol vorsichtig gemischt. Nach erneuter Zentrifugation (4 °C, 14.500 x g, 20 min) wurde der Überstand verworfen und das Sediment unter einer Sterilbank getrocknet. Abschließend wurde es in 50 µl H₂O_{Bidest} gelöst und bei -20 °C gelagert.

3.2.1.2 Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid DNA wurde aus *E. coli* nach Herstellerangaben mit Hilfe des *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) isoliert. Für diesen Zweck wurden 5 ml LB-Medium in 15 ml Plastikröhrchen mit 5 µl Ampicillin (100 mg/ml) versetzt und anschließend mit einer einzelnen *E. coli* Kolonie angeimpft. Die Kultur wurde für 24 h bei 250 rpm und 37 °C inkubiert, bevor die Plasmidpräparation nach Herstellerangaben erfolgte. Die Plasmid DNA wurde am Ende in 50 µl sterilem H₂O_{Bidest} aufgenommen.

3.2.1.3 Präparation von Gesamt-RNA aus Pilzmyzel

Die Inokulation von 100 ml PD-Medium in 300 ml Erlenmeyerkolben erfolgte mit 750.000 Makrokonidien (siehe 3.1.1.2). Nach einer Inkubation von 24 h im Dunkeln bei 23 °C und 150 rpm wurde bei den Fungizidvarianten die entsprechende Tebuconazol-Konzentration eingestellt (0, 5, 10 oder 15 µg/ml) und für 16 h weiter inkubiert. Da die Tebuconazol-Stammlösung in Aceton angesetzt war, enthielten alle Kolben eine Acetonkonzentration von 0,2 %. Jede Variante wurde mit vier technischen Wiederholungen geführt. Zur Ernte wurden die Kolben auf 4 °C gekühlt bevor das Myzel über eine Thermo Scientific Nalgene *Reusable Bottle Top Filter Unit* unter Verwendung von Rundfiltern

(Typ 112A, Karl Roth GmbH Co. KG) vom Kulturfiltrat getrennt wurde. Das geerntete Myzel wurde zu jeweils 70 mg Myzel aliquotiert, um dann in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert zu werden. Zur RNA-Isolation wurde je ein Aliquot in flüssigem Stickstoff in einem Mörser zermahlen, das erhaltene Pulver in ein 2 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und mit 1 ml TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) versetzt. Die sich direkt anschließende RNA-Isolation wurde entsprechend der Anleitung mit dem PureLink™ RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt. Während der RNA-Isolation wurde der dort erwähnte optionale Schritt für den Verdau der restlichen DNA mit dem PureLink™ DNase Set nach Anleitung durchgeführt. Die RNAs wurden final in 50 µl Nuklease freiem Wasser (nicht DEPC behandelt; Ambion, USA) aufgenommen und bei -70 °C gelagert.

3.2.1.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte spektrophotometrisch (DeNovix DS-11 Fx + Spektrophotometer/Fluorometer, DeNovix, Wilmington, USA). Die Verhältnisse OD_{260}/OD_{280} und OD_{260}/OD_{230} ließen Rückschlüsse auf die Reinheit der Nukleinsäuren zu. Alle OD_{260}/OD_{230} Werte der verwendeten Präparationen lagen zwischen 2,0 und 2,2. Präparationen mit niedrigeren Werten wurden verworfen.

3.2.1.5 Qualitätsbestimmung der RNA

Um die Quantität der RNA zu bestimmen, wurde zum einen der 2100 Bioanalyzer mit dem Agilent RNA 6000 Nano-Kit (5-500 ng/µl) (Agilent Technologies, Waldbronn, DE) nach Anleitung verwendet. Die Software des Gerätes analysierte die Elektropherogramme zur Bestimmung verschiedener Werte. Zum einen wies ein 28S/18S-rRNA Verhältnis von zwei auf eine Präparation ohne RNA-Abbau hin. Zum anderen wiesen *RNA Integrity Number* (RIN)-Werte von mindestens fünf auf eine für qRT-PCR ausreichende Qualität hin. RNA-Präparationen, die für RNAseq Versuche verwendet wurden, mussten mindestens einen RIN-Wert von sieben aufweisen. Für die, an die Firma GenomeScan (Leiden, Niederlande) verschickten RNAseq Proben liegen zusätzlich zu den RIN-Werten, von der Firma erhobene *RNA Quality Number* (RQN)-Werte vor. Die RQN-Werte aller Proben mussten mindestens größer als sechs sein. Ferner wurde eine RT-PCR (siehe 3.2.2.3) durchgeführt, um auf das Vorhandensein von DNA zu testen.

3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.2.2.1 Standard-PCR

Standard PCR Reaktionen hatten ein Volumen von je 10 µl und wurden in den TProfessional und TPersonal Thermocyclern der Firma Biometra (Biometra GmbH, Göttingen, DE) durchgeführt. Die DreamTaq™ DNA Polymerase und die Phusion - High Fidelity DNA Polymerase wurden über die Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) bezogen.

Reaktionsansatz für eine Standard-PCR mit der Taq Polymerase (DreamTaq™):

Reagenz	Stammkonzentration	Endkonzentration	Eingesetztes Volumen
ThermoPol Puffer	10 x	1 x	1 µl
dNTP's	10 mM	0,2 mM	0,2 µl
Vorwärts Primer	2 µM	0,2 µM	1 µl
Rückwärts Primer	2 µM	0,2 µM	1 µl
Taq Polymerase	5 Units/ ml	0,05 Units	0,2 µl
Matrize DNA (1-10 ng) ad 10 µl H ₂ O _{Bidest}			

Reaktionsansatz für eine Standard-PCR mit der Phusion Polymerase:

Reagenz	Stammkonzentration	Endkonzentration	Eingesetztes Volumen
HF Puffer	5 x	1 x	2 µl
dNTP's	10 mM	0,2 mM	0,2 µl
Vorwärts Primer	2 µM	0,2 µM	1 µl
Rückwärts Primer	2 µM	0,2 µM	1 µl
Phusion Polymerase	2 Units/ ml	0,02 Units	0,1 µl
Matrize DNA (1-10 ng) ad 10 µl H ₂ O _{Bidest}			

PCR-Programm für Reaktionen mit der Taq Polymerase (DreamTaq™):

Schritt	Temperatur	Zeit	Prozess	Zyklen
Heizdeckel: 96 °C				
1	96 °C	Pause	Einsetzen der Proben	
2	96 °C	1:00	Initiale Denaturierung	1
3	96 °C	0:30	Denaturierung	25-35
4	X (T _m + 3 °C)	0:30	Hybridisierung	
5	72 °C	X	Verlängerung	
6	72 °C	3:00	Auffüllung der Enden	1
7	12 °C	Pause		

PCR-Programm für Reaktionen mit der Phusion Polymerase:

Schritt	Temperatur	Zeit	Prozess	Zyklen
Heizdeckel: 98 °C				
1	98 °C	Pause	Einsetzen der Proben	
2	98 °C	1:00	Initiale Denaturierung	1
3	98 °C	0:15	Denaturierung	25-35
4	X (T _m) + 3 °C	0:15	Hybridisierung	
5	70 °C	X	Verlängerung	
6	70 °C	3:00	Auffüllung der Enden	1
7	12 °C	Pause		

Die Taq Polymerase amplifiziert circa 1 kb pro Minute, wohingegen die Phusion Polymerase circa 1 kb pro 30 Sekunden amplifiziert. In Abhängigkeit von diesen beiden Parametern wurde die Elongationsdauer je nach der Größe des zu amplifizierenden Fragmentes berechnet. Die Schmelztemperatur T_m wurde mit der folgenden Formel berechnet und lag idealerweise um die 60 ± 2 °C: $T_m = 69,5 \text{ °C} + (0,41 \times \text{GC-Gehalt}) - (650 / \text{Anzahl der Basen des Primers})$. Neben der höheren Aktivität bietet die Phusion Polymerase die Vorteile, dass sie längere Produkte, d.h. bis zu 10 kb, erzeugen kann und wegen einer 3' → 5' Exonucleaseaktivität eine bis zu 50 fach niedrigere Fehlerrate aufweist als die normale Taq-Polymerase. In Experimenten, bei denen die niedrigere Fehlerrate gegenüber der Phusion Polymerase keine Rolle spielte, wurde die günstigere Taq-Polymerase verwendet.

3.2.2.2 Double-Joint-PCR

Die aus drei Teilreaktionen bestehende DJ-PCR (Yu et al., 2004) wurde zur Erzeugung der zu transformierenden DNA-Konstrukte angewendet. In der ersten Reaktion erfolgte die Erzeugung von drei oder mehr Teilfragmenten mit definierten Überhängen, an welchen in der nachfolgenden Reaktion die Fusionen stattfinden konnten. In der zweiten Reaktion erfolgte die Zusammenfügung der drei Teilfragmente zu einem Produkt. Dabei handelt es sich um eine Reaktion, für welche keine Primer benötigt wurden, da die Teilfragmente über komplementäre Überhänge an den Fusionsstellen verfügten. Sie dienten somit selbst als eine Art Primer. Für die abschließende dritte Reaktion (*Nested-PCR*) wurde die zweite Reaktion nach 10 Zyklen unterbrochen, um die *Nested-Primer* zuzugeben, die an den äußeren Bereichen des Fusionsproduktes um wenige Basenpaare nach innen versetzt binden. Das Ziel dieser dritten Reaktion war es, mögliche Nebenprodukte auszuschließen und die Ausbeute des gewünschten Produktes zu steigern. Alle Schritte wurden mit dem Enzym *Phusion – High Fidelity Polymerase* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt.

Reaktionsansatz der ersten Reaktion:

Reagenz	Stammkonzentration	Endkonzentration	Eingesetztes Volumen
HF Puffer	5 x	1 x	10 µl
dNTPs	10 mM	0,2 mM	1 µl
Vorwärts Primer	2 µM	0,2 µM	5 µl
Rückwärts Primer	2 µM	0,2 µM	5 µl
Phusion Polymerase	2 Units/ ml	0,02 Units	0,5 µl
Matrize DNA (10-50 ng) ad 50 µl H ₂ O _{Bidest}			

Alle PCR-Produkte wurden durch das GeneJET PCR Purification Kit (Fisher Scientific, Schwerte, DE) aufgereinigt. Auf diese Weise wurden Reste von Primern und Nukleotiden entfernt.

Reaktionsansatz der zweiten und dritten Reaktion:

Reagenz	Stammkonzentration	Endkonzentration	Eingesetztes Volumen
HF Puffer	5 x	1 x	10 µl
dNTPs	10 mM	0,2 mM	1 µl
Vorwärts Primer	2 µM	0,2 µM	5 µl
Rückwärts Primer	2 µM	0,2 µM	5 µl
Phusion Polymerase	2 Units/ml	0,02 Units	0,5 µl
Produkte der ersten PCR-Reaktion			1:3:1 bzw. 1:3:1:3:1 (molares Verhältnis)
ad 50 µl H ₂ O _{Bidest}			

PCR-Programm der ersten Reaktion: (siehe 3.2.2.1)

PCR-Programm der zweiten und dritten Reaktion:

Schritt	Temperatur	Zeit	Prozess	Zyklen
Heizdeckel: 98 °C				
1	98 °C	Pause	Einsetzen der Proben	
2	98 °C	0:30	Initiale Denaturierung	1
3	98 °C	0:20	Denaturierung	10
4	60 °C	0:20	Hybridisierung	
5	72 °C	1:00	Verlängerung	
6	72 °C	Pause	Zugabe der <i>Nested</i> -Primer	
7	98 °C	0:20	Denaturierung	25
8	X (T _m + 3 °C)	0:20	Hybridisierung	
9	72 °C	X	Verlängerung	
10	72 °C	5:00	Auffüllung der Enden	1
11	12 °C	Pause		

Die Berechnung der Elongationszeit richtete sich nach der Länge der zu amplifizierenden Fragmente.

Die Schmelztemperatur T_m lag idealerweise um die 60 ± 2 °C (Berechnung siehe 3.2.2.1).

3.2.2.3 RT-PCR

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das QIAGEN™ OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, DE) gemäß den Angaben des Herstellers eingesetzt. Mit dem verwendeten Primerpaar (Cof.FG06245.F1 und Cof.FG06245.R1), konnte im Fall von kontaminierender gDNA, die ein Intron enthält, ein 300 bp langes und im Fall von RNA ein 179 bp langes Fragment amplifiziert werden. Beide Primer binden im Cofilin Gen, das für ein Protein kodiert, welches Actin depolymerisiert. Nach der RT-PCR wurde der jeweilige Ansatz in einem 1,5 %igen (w/v) TAE Agarosegel aufgetrennt.

PCR-Schema:

<u>Reagenz</u>	<u>Stammkonzentration</u>	<u>Endkonzentration</u>	<u>Eingesetztes Volumen</u>
RT-PCR Puffer	5 x	1 x	2 µl
dNTP Mix	10 mM dNTPs	0,4 mM dNTPs	0,4 µl
5x Q-Solution	5 x	1 x	2 µl
Cof.FG06245.F1	10 µM	0,6 µM	0,6 µl
Cof.FG06245.R1	10 µM	0,6 µM	0,6 µl
RT-PCR Enzym Mix	-	-	0,4 µl
Matrize RNA 2 µl (25 ng/µl) / DNA 1 µl (10 ng/µl)			
ad RNase freies H ₂ O _{Bidest}			

PCR-Programm:

<u>Schritt</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>	<u>Prozess</u>	<u>Zyklen</u>
Heizdeckel: 98 °C				
1	50 °C	Pause		
2	50 °C	30:00	Reverse Transkription	1
3	95 °C	15:00	Aktivierung der HotStarTaq DNA Polymerase + Initiale cDNA Denaturierung + Deaktivierung der Reversen Transkriptasen	1
4	94 °C	0:30	Denaturierung	29
5	54 °C (5°C < T _m)	0:30	Hybridisierung	
6	72 °C	1:00	Verlängerung	
7	72 °C	10:00	Auffüllung der Enden	1
8	12 °C	Pause		

3.2.3 Gelelektrophorese

Es wurden Gele mit 0,7 % (w/v) Agarose und 1,5 % (w/v) Agarose verwendet (Seakem LE-Agarose; Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf). Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht und nach dem Abkühlen in einen Gelträger gegossen. Die Proben wurden mit 6 x Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard wurden DNA-Fragmente definierter Längen (GeneRuler™ DNA Ladder Mix und GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung (60 – 100

Volt) in einer Elektrophoresekammer. Die Färbung des Gels erfolgte in einer 0,12 %igen Ethidiumbromid-Lösung für 15 bis 20 min. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines Geldokumentationssystems der Firma Analytik Jena (Jena, DE).

3.2.4 Klonierung von DNA-Fragmenten in *Escherichia coli*

3.2.4.1 Erzeugung von DNA-Fragmenten

Die zu klonierenden DNA-Fragmente wurden mittels PCR (siehe 3.2.2.1) erzeugt. Die PCR-Produkte wurden anschließend im Agarose-Gel aufgetrennt und dann in einer 0,01 % Methylenblaulösung für eine halbe bis eine Stunde inkubiert, anschließend in H₂O_{VE} entfärbt, um dann auf einem Fototisch die gewünschten Banden auszuschneiden. Die Gelelution der DNA erfolgte entsprechend den Herstellerangaben mit dem *GeneJET Gel Extraction Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

3.2.4.2 Ligation von DNA-Fragmenten mit Plasmid-DNA

Für die Ligation der DNA-Fragmente mit Plasmid-DNA wurde das *CloneJET™ PCR Cloning Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Die Phusion-Polymerase erzeugt aufgrund ihrer *proofreading*-Aktivität überhangfreie DNA-Enden, weswegen das Plasmid pJET1.2/blunt verwendet wurde.

Standard-Ligationsansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 µl:

Reagenz	Eingesetztes Volumen
Reaction Buffer	1 µl
PCR-Produkt	X µl (75 ng bei gleicher bp Anzahl von Plasmid und Fragment)
pJET1.2/blunt cloning vector	0,5 µl (25 ng/µl)
T4 DNA Ligase	0,5 µl
Wasser, Nuclease-frei	ad 10 µl

Der Reaktionsansatz wurde nach 30-minütiger Inkubation bei RT direkt für die *E. coli* Transformation eingesetzt.

3.2.4.3 Transformation von *Escherichia coli*

Ein 100 µl Aliquot chemisch kompetenter Zellen (siehe 3.1.2.2) wurde für 15 min auf Eis aufgetaut und nach Mischung mit maximal 10 µl der Ligations-Reaktion für 30 min auf Eis inkubiert. Dann folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 sec und eine Inkubation auf Eis für 2 min. Anschließend wurden 900 µl LB-Medium zugegeben und bei 37 °C und 250 rpm für 1 h inkubiert. Der Ansatz wurde schließlich auf drei

LB_{amp}-Petrischalen zu 9, 90 und 900 µl ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Vermehrung von Transformanten wurden am nächsten Tag jeweils 5 ml LB/Amp100 mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm im Kulturschüttler inkubiert.

3.2.5 Transformation von *Fusarium graminearum*

5 x 10⁶ Makrokonidien (siehe 3.1.1.2) wurden in 100 ml YEPD-Medium inokuliert und für 12 h inkubiert (28 °C, 175 rpm). Die Kultur wurde abfiltriert (Rundfilter, 90 mm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE) und das Myzel in einen 100 ml Kolben, mit dem vorgelegten Protoplastierungs-Mix überführt. Während der Inkubation bei 30 °C und 90 rpm wurde in den folgenden drei bis vier Stunden der Fortschritt der Protoplastierung unter dem Mikroskop verfolgt. Die Protoplasten wurden durch eine Lage Miracloth (Merck, Darmstadt, DE), in ein 50 ml Plastikröhrchen überführt und zentrifugiert (3000 rpm, 4 °C, 15 min). Der Überstand wurde verworfen, die sedimentierten Protoplasten in 5 ml STC-Puffer aufgenommen und bei 3000 rpm, 4 °C, 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Protoplasten in 100 µl STC-Puffer resuspendiert und auf Eis gestellt.

Für jeden Transformationsansatz wurden 100 µl dieser Suspension in ein Mikroreaktionsgefäß überführt, mit 100 µl STC-Puffer, 50 µl 30 % (w/v) PEG8000 und maximal 50 µl des zu transformierenden Konstruktes (6-8 µg) vorsichtig gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. In ein 15 ml Plastikröhrchen wurden 2 ml 30 % PEG8000 vorgelegt und der Transformationsmix zugegeben. Der Ansatz wurde nun invertiert, fünf min später mit vier ml STC-Puffer vermischt und auf Eis gestellt. 600 µl der Transformationsreaktion wurden in einem 15 ml Plastikröhrchen mit 15 ml Regenerationsmedium gemischt und dann in eine Petrischale (ø85 mm) gegossen. Auf diese Weise wurde mit dem Rest des Ansatzes verfahren, so dass 10 Petrischalen für jedes transformierte Konstrukt bei 26 °C über Nacht inkubiert wurden. 10 – 14 h nach dem Ausplattieren, noch bevor die ersten Hyphen die Oberfläche des Agars erreichten, wurde auf das Regenerationsmedium eine zweite Schicht von 15 ml Regenerationsmedium gegossen, welches das entsprechende Antibiotikum in einer Konzentration von 200 µg/ml enthielt. Nach Diffusion wurde so eine finale Konzentration von 100 µg/ml im gesamten Agar erreicht. Nach drei bis vier Tagen konnten die Transformanten auf SNA-Petrischalen (ø55 mm) mit 100 µg/ml Antibiotikum überimpft werden. Davon ausgehend wurden SNA-Petrischalen inokuliert, um Macrosporen zu gewinnen. Etwa ein Viertel einer Petrischale wurde nach 10 Tagen mit zwei ml H₂O_{Bidest} abgespült und 100 µl dieser unverdünnten Sporensuspension wurden mit einem Drigalski-Spatel auf SNA-Petrischalen mit 100 µg/ml Antibiotikum ausgestrichen. Nach etwa drei bis sieben Tagen wurden jeweils zwei Einzelkolonien auf neue SNA-Petrischalen mit 100 µg/ml Antibiotikum überimpft. Bei diesen Einzelkolonien handelte es sich um Einzelspor- bzw. monokaryotische Isolate. Diese zuletzt genannten SNA-Petrischalen dienten nach Bestätigung der

richtigen Integration mittels Southern-Blot-Hybridisierungsverfahren als Ausgangsmaterial zur Herstellung der Dauerkulturen. Sämtliche SNA-Petrischalen wurden bei 25 °C im Dunkeln inkubiert.

3.2.6 Southern-Blot-Hybridisierung

Nach der Minipräparation (siehe 3.2.1.1.1) wurde mit der gDNA monokaryotischer Isolate (siehe 3.2.5) eine Test-PCR durchgeführt (siehe 3.2.2.1). Zu diesem Zweck wurden der Vorwärts-Primer, der für die Erzeugung der linken 5´-Flanke genutzt wurde und der Rückwärts-Primer, der für die Erzeugung der rechten 3´-Flanke genutzt wurde, verwendet (siehe 3.2.2.2). Diese beiden Primer banden außerhalb der *Nested*-Primer, welche zur Amplifizierung des zu transformierenden Konstruktes verwendet wurden. Auf diese Weise war es möglich, erste Hinweise zu erhalten, ob eine homologe (Typ III) Integration des Konstruktes stattgefunden hatte. Es konnte allerdings keine Aussage dazu getroffen werden, ob das Konstrukt im Ganzen oder bruchstückhaft zusätzlich noch an anderen Stellen in das Genom integriert wurde. Daher wurden von Klonen mit einer mutmaßlichen Typ III Integration auch noch Southern-Blot-Hybridisierungen durchgeführt.

3.2.6.1 Herstellung Digoxigenin-markierter Sonden

Mittels PCR wurden Digoxigenin (DIG)-markierte Sonden hergestellt. Zu diesem Zweck wurde ein DIG-dNTP-Mix aus je zwei mM dATP, dCTP, dGTP sowie aus 0,19 mM dTTP und 0,1 mM DIG-dUTP (Roche Diagnostics, Mannheim, DE) verwendet. Zur Kontrolle wurden in einem parallelen Ansatz unmarkierte Standard dNTPs verwendet. Als Matrize dienten die aus *E. coli* Transformaten isolierten und aufgereinigten Plasmide, die das nachzuweisende Transformationskonstrukt enthielten. Es wurde das Standard PCR-Programm (siehe 3.2.2.1) verwendet. Die Taq DNA Polymerase mit dem ThermoPol™ Puffer (M0267) (New England Biolabs, Ipswich, USA) wurde als Polymerase eingesetzt.

PCR-Schema mit der Taq-Polymerase:

<u>Reagenz</u>	<u>DIG markierte dNTPs</u>	<u>unmarkierte Standard dNTPs</u>
ThermoPol™ Puffer	5 µl	5 µl
dNTPs bzw. DIG-dNTP-Mix	2 µl	1 µl
Vorwärts Primer	5 µl	5 µl
Rückwärts Primer	5 µl	5 µl
Taq DNA Polymerase	1 µl	1 µl
Matrize	1 µl	1 µl
ad 50 µl H ₂ O _{Bidest}		

Der Ansatz mit den DIG-markierten dNTPs wurde mit dem *GeneJET PCR Purification Kit* (Fisher Scientific, Schwerte, DE) aufgereinigt. Der erfolgreiche Einbau der DIG-dUTPs wurde gelelektrophoretisch überprüft (siehe 3.2.3).

3.2.6.2 Restriktionshydrolyse von DNA

Jeweils fünf µg gDNA (siehe 3.2.1.1.2) wurden mit 20 Units des benötigten Restriktionsenzym (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA oder New England Biolabs, Ipswich, USA) in einem Volumen von 30 µl über Nacht gemäß den Herstellerangaben verdaut. Zur Überprüfung der Vollständigkeit der Reaktion, wurde ein Aliquot des Ansatzes nach Herstellerangaben auf ein 0,7 %iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 3.2.3). In vollständig verdauten Ansätzen wurde das Enzym schließlich nach Herstellerangaben inaktiviert.

3.2.6.3 Fixierung, Hybridisierung und Detektion

25 µl des Ansatzes wurden zusammen mit 5 µl 6 x TAE-Puffer, auf ein circa 1 cm dickes 0,7 %iges Agarosegel aufgetragen und bei 60 V für 3 h elektrophoretisch aufgetrennt. Das Agarosegel wurde dann mit H₂O_{VE} abgespült und anschließend für 30 min in 0,25 M HCL auf einem Taumelschüttler bei 30 rpm geschwenkt. Bei diesem Schritt wurde die genomische DNA depuriniert, was zur teilweisen Fragmentierung der DNA führte und den Transfer auf die Membran erleichterte. Danach wurde das Agarosegel erneut mit H₂O_{VE} abgespült und für 30 min in 0,4 M NaOH geschwenkt. Bei diesem Schritt wurde die dsDNA in ssDNA umgewandelt. Nach einem kurzen Waschschrift in H₂O_{VE} wurde die DNA durch einen abwärts gerichteten Kapillartransfer über Nacht auf eine positiv geladene Hybond-N+ Nylonmembran (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, DE) übertragen. Der Blot wurde folgendermaßen von unten nach oben aufgebaut:

4 cm hoher Papierstapel

3 Lagen Filterpapier (Whatman™ 3MM Cellulose von Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA); zuvor in 20 x SSC-Transferpuffer getränkt

Nylonmembran (zuvor in 20 x SSC-Transferpuffer getränkt)

Agarosegel (Öffnung der Ladetaschen nach oben, vor Transfer entfernt)

3 Lagen Filterpapier (Whatman™ 3MM Cellulose von Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA); zuvor in 20 x SSC-Transferpuffer getränkt

Brücke aus Filterpapier (Whatman™ 3MM Cellulose von Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA); zuvor in 20 x SSC-Transferpuffer getränkt

Glas-Petrischale oder Gelträger

Gewicht (gefüllte 250ml Blaukappflasche)

Links und rechts neben dem Blotaufbau wurden zwei flache Schüsseln mit 20 x SSC-Transferpuffer gestellt und die beiden Enden der Papierbrücke wurden in diese Schüsseln gelegt. Durch Bestrahlung

mit UV-Licht (Cross-Linking) wurde die ssDNA am folgenden Morgen mit der Nylonmembran kovalent verknüpft.

Zur Prähybridisierung wurde die Nylonmembran in eine Glasröhre gesteckt und für 2 h bei 65 °C in vorgewärmtem Hybridisierungspuffer (siehe 8.4.2) in einem Hybridisierungssofen (Biozym Diagnostic GmbH, Hess. Oldendorf) inkubiert. Anschließend wurde die Dig-markierte Sonde für 5 min bei 99 °C denaturiert und danach unmittelbar auf ein Gemisch aus Eis, kaltem Wasser und NaCl gestellt. Von der Sonde wurden 6 µl dem Hybridisierungspuffer zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 68 °C über Nacht. Am folgenden Morgen wurde der Hybridisierungspuffer mit der darin enthaltenen Sonde verworfen und mehrere Waschschriffe in der Glasröhre durchgeführt, wobei die Waschlösungen vorgewärmt waren.

20 ml 2 x Waschlösung; Inkubation bei RT für 5min

20 ml 2 x Waschlösung; Inkubation bei RT für 5min

20 ml 0,5 x Waschlösung; Inkubation bei 65 °C für 15min

20 ml 0,25 x Waschlösung; Inkubation bei 65 °C für 15min

20 ml Waschpuffer M; Inkubation bei RT für 1 min

Anschließend wurde die Nylonmembran für 1 h bei RT in 20 ml 1 x Blockingreagenz (4 ml 10 x Blockingreagenz (Roche Diagnostic, Mannheim, DE) + 36 ml Maleinsäurepuffer) inkubiert. Dann wurden 4 µl anti-DIG-AP-Fab-Fragment (Roche Diagnostic, Mannheim, DE) zugegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschschriff mit 20 ml Waschpuffer M (siehe 8.4.2) bei RT für 10 min, durch welchen unspezifisch- und nicht gebundene Antikörper entfernt wurden. Dieser Waschschriff wurde zweimal wiederholt, ehe die Nylonmembran mit 20 ml Detektionspuffer für 2 min bei RT inkubiert wurde. Sie wurde dann der Glasröhre entnommen, in einen Folienhalbschlauch (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE) gelegt und mit sechs Tropfen CSPD-Lösung (Roche Diagnostics, Mannheim, DE) beträufelt. Sie wurde dann luftblasenfrei auf die Innenseite einer Schlauchhälfte gelegt und für fünf Minuten im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Nylonmembran luftblasenfrei in einen neuen Folienhalbschlauch gelegt. Schließlich wurde der Folienhalbschlauch mit der darin befindlichen Nylonmembran im Dunkeln in eine Filmkassette gelegt und unter und über ihn wurde je ein Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, DE) platziert. Der Röntgenfilm wurde mit Hilfe einer Optimax TR Entwicklermaschine (MS Laborgeräte, Heidelberg, DE) entwickelt. In der Regel wurde der erste Film 3 h nach Auflegen des Röntgenfilms entwickelt, der zweite nach circa 14 - 16 h.

3.2.7 Sanger-Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, DE, durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde das zu sequenzierende DNA-Produkt zuerst mittels Standard PCR erzeugt (siehe 3.2.2.1) und dann mit dem GeneJET PCR Purification Kit (Fisher Scientific, Schwerte, DE) aufgereinigt. Das PCR-Produkt hatte eine Länge von 1000 bis 3000 bp und wurde auf eine Konzentration von 10 ng/µl eingestellt. Es wurden 15 µl des aufgereinigten PCR-Produktes mit 2 µl des für die Sequenzierreaktion benötigten Primers (10 µM) gemischt und als *Premixed Sample* an die beauftragte Firma verschickt. Die Sequenzierung diente zur Prüfung, ob im Genom der für die weiteren Experimente ausgewählten Mutanten am Ziellocus unerwünschte Veränderungen stattgefunden haben. Von besonderer Wichtigkeit waren zum einen die flankierenden Bereiche, welche z.T. weitere Gene enthielten, und zum anderen, dass an der entscheidenden Stelle im ORF des *AZR1* Genes das richtige Nukleotid vorhanden war.

3.2.8 Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung (RNA-Seq)

Das Ziel der RNA-Seq war es, den Einfluss einer Fungizidbehandlung auf die in dieser Arbeit erzeugten transgenen Stämme und auf die Referenzstämme zu vergleichen. Auf diese Weise sollte herausgefunden werden, welche Gene unter welchen Bedingungen höhere oder reduzierte Transkriptgehalte aufwiesen. Jedes Isolat war innerhalb einer Behandlung durch vier technische Wiederholungen repräsentiert. Die dafür an die Firma GenomeScan (Leiden, Niederlande) versendeten Gesamt RNAs wurden, wie unter Punkt 3.2.1.3 erläutert, isoliert, quantifiziert und deren Qualität bestimmt. Die RNA-Seq wurde von GenomeScan unter Verwendung des Illumina NovaSeq 6000 und des HiSeq4000 Sequenzierungssystems und der sogenannten *Paired-End* Sequenzierungsstrategie (150 bp) durchgeführt. GenomeScan führte unter Verwendung ihres RNA-Seq v4 Arbeitsablaufplanes, welcher in der *standard operating procedure* SOP 70 beschrieben ist, die Daten Vor-Prozessierung und die Genexpressionsanalyse durch (https://www.genomescan.nl/wp-content/uploads/PDF/GenomeScan_Bioinformatics-mRNASeq-Analysis_Guidelines.pdf). Als Referenzgenom wurde das Genom des *F. graminearum* Stammes PH-1 (RR1) verwendet (http://fungi.ensembl.org/Fusarium_graminearum/Info/Index; Stand der Assemblierung: August 2016). Diese Version der genomischen Sequenz wurde von Rothamsted Research erzeugt und über das European Nucleotide Archive (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB5475>) bezogen.

Im Folgenden wird der Ablauf der durch GenomeScan durchgeführten RNA-Seq Analyse kurz dargestellt. Als erstes wurde die an GenomeScan versendete Gesamt RNA hinsichtlich ihrer Qualität analysiert und schließlich gereinigt. Es erfolgte eine Filterung nach mRNA, um im Folgenden ausschließlich mit dieser weiterzuarbeiten. Als Methode wurde die Poly-A-Schwanz Selektion der

mRNA unter Verwendung von Oligo (dT) Primern angewendet. Die erhaltene mRNA wurde fragmentiert und daraus cDNA synthetisiert. Es folgte eine erneute Reinigung, die Reparatur der Fragmentenden und die Ligation von Adaptern an die cDNA-Fragmente. Letztere dienen der Anheftung der zu sequenzierenden cDNA-Fragmente an die Sequenzierungsplattform. Nach der Auftrennung im Agarosegel schlossen sich eine PCR, ein Reinigungsschritt und schließlich die Sequenzierung an. Nach einer Qualitätsfilterung folgte das Alignment der sequenzierten cDNA-Fragmente (Reads) gegen das Referenzgenom. Die Zugehörigkeit eines jeden Fragmentes zu dem jeweiligen Chromosom und die exakte Position auf diesem waren somit bekannt. Dann wurde die Anzahl an *Reads* pro Gen quantifiziert. Die Daten wurden im Anschluss normalisiert und als Ergebnis wurden die sogenannten *Fragments Per Kilobase Of Exon Per Million Reads Mapped* (FPKM) Werte erhalten. Nach einer Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis, PCA) erfolgte die Identifizierung der differentiell exprimierten Gene mit Hilfe des DESeq2 Paketes der Software R. Innerhalb der durchgeführten sieben paarweisen Vergleiche wurden die signifikant über- oder unterexprimierten Gene anhand ihrer *log2 fold change* Werte identifiziert, selektiert und auf der Basis ihrer korrigierten p-Werte (Obergrenze von $p=0,05$) sortiert.

3.2.9 Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) Marker Analyse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein CAPS Marker Verfahren entwickelt, um den entscheidenden Aminosäureaustausch an Position 368 im ORF des *AZR1* Gens effizient in einer großen Zahl von Isolaten nachweisen zu können. Dieses Testverfahren macht sich das Vorhandensein, bzw. die Abwesenheit einer Restriktionsenzymstichstelle zu nutze.

Zunächst wurde eine Standard PCR (siehe 3.2.2.1) mit der gDNA (siehe 3.2.1.1) des zu untersuchenden Isolates mit der Phusion Polymerase und den beiden Primern Seq.SNP.P1.AllelAZR1.F1 und Seq.SNP.P1.AllelAZR1.R1 durchgeführt, was zu einem 999 bp Produkt führte. Die 10 μ l Ansätze wurden im Anschluss mit dem GeneJET PCR Purification Kit (Fisher Scientific, Schwerte, DE) aufgereinigt und mit 50 μ l H_2O_{Bidest} eluiert. Zur Überprüfung der Fragmentlänge und der –qualität wurden 2 μ l auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss wurden 10 μ l des PCR-Produktes mit dem Restriktionsenzym *PciI* verdaut (siehe 3.2.6.2). Das Restriktionsenzym wurde inaktiviert (80 °C, 20 min) und 2 μ l des Verdaus auf ein Agarosegel aufgetragen. Im Fall des WT-Allels von *AZR1* entstanden zwei Fragmente mit den Größen 314 und 685 bp. Wenn jedoch der in dieser Arbeit untersuchte SNP vorlag, entstanden drei Fragmente mit den Größen 189, 314 und 496 bp, da der integrierte SNP im *AZR1* Gen eine weitere Schnittstelle des Restriktionsenzym *PciI* entstehen lässt. Die CAPS Marker Analyse diente zum einen der Überprüfung der generierten Mutanten. Zum anderen

ist sie für eine schnelle und kostengünstige Analyse von Feldisolaten gut geeignet, was hier in kleinerem Umfang durchgeführt wurde.

3.3 Vitalitätsbestimmung

3.3.1 Bestimmung der Sporenmorphologie und der Sporenkeimung

Makrokonidien wurden aus MBB-Kulturen geerntet (siehe 3.1.1.2), ausgezählt und mit PD-Medium auf 1×10^5 Sporen/ml eingestellt. Anschließend wurden 2 µl der Sporensuspension mit 8 µl PD-Medium auf einen Objektträger pipettiert. Unter dem Lichtmikroskop wurden die Morphologie und die Septierung der Makrokonidien betrachtet und zwischen den Isolaten verglichen.

Zur Bestimmung der Keimrate wurde die Sporensuspension in einem Mikroreaktionsgefäß bei 23 °C für 6 h inkubiert, um anschließend 2 µl zu entnehmen und mit 8 µl PD-Medium auf einem Objektträger zu mischen. Für jedes Isolat wurden in sechs technischen Wiederholungen jeweils 100 Makrokonidien untersucht. Das Experiment wurde in drei biologischen Wiederholungen durchgeführt. Auch die Morphologie und Keimung der Ascosporen wurde auf ähnliche Weise untersucht.

Die Ascosporen wurden, wie unter Punkt 3.3.3 beschrieben erhalten. Hierbei wurden je Isolat und biologischer Wiederholung 6 x 100 Ascosporen ausgezählt. Insgesamt wurde das Experiment in drei biologischen Wiederholungen durchgeführt.

3.3.2 Bestimmung des vegetativen Wachstums

Um das vegetative Wachstum der Isolate zu bestimmen, wurde sie auf PDA, SNA, KMA und MMA inokuliert und bei 25 °C im Dunkeln inkubiert (siehe 8.4.1). Darüber hinaus wurde das vegetative Wachstum auf PDA auch bei 15 und 30 °C im Dunkeln verfolgt. Die Nährmedium wurden in der Mitte mit 10 µl einer Makrokonidien-Suspension (1000 Sporen/µl; siehe 3.1.1.2) angeimpft. Pro Isolat wurden drei biologische Wiederholungen mit jeweils fünf technischen Wiederholungen durchgeführt. Das radiale Wachstum wurde im Fall von PDA (25 und 30 °C) und KMA über drei Tage, von SNA über vier Tage und von PDA (15 °C) und MMA über fünf Tage hinweg täglich mit der Hilfe eines Lineals gemessen und am letzten Tag der Messreihe fotografisch dokumentiert. Der Durchmesser wurde pro Platte zweimal gemessen, wobei die beiden Messstrecken im 90 ° Winkel zueinander versetzt waren. Die Erfassung wurde eingestellt, sobald die Hyphenfront eines Isolates im Experiment nur noch 1 cm Abstand zur Petrischalenwand aufwies. Der Inokulationstropfen (\varnothing 0,7 cm) wurde subtrahiert, die Wachstumsrate in cm/Tag berechnet. Die MMA- und SNA-Petrischalen wurden nochmal nach 14 dpi fotografiert.

3.3.3 Test auf Fähigkeit zur sexuellen Reproduktion

Die Fähigkeit zur sexuellen Reproduktion wurde nach einem modifizierten Protokoll von Cavinder et al. (2012) überprüft. Jedes Isolat wurde auf Petrischalen (\varnothing 85 mm) mit KMA (siehe 8.4.1) inokuliert und bei RT (23 °C) und normalem Tag-Nacht-Rhythmus in Fensternähe inkubiert, bis das Myzel den Petrischalenrand erreicht hatte (circa fünf Tage). Das Luftmyzel wurde anschließend mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Nun wurde mit einem Drigalskispatel 1 ml 2,5 % Tween60 auf dem Myzel ausgestrichen und die Kultur wurde wie zuvor weiter inkubiert. Bildete sich erneut Luftmyzel, so wurde dieses wieder entfernt und erneut 1 ml 2,5 % (v/v) Tween60 ausgestrichen. Die Petrischalen wurden so lange inkubiert, bis sie aufgrund der gebildeten Perithezien schwarz erschienen (> 7 d). Unter dem Stereomikroskop konnte man sehen, dass dann bereits gelbliche Asci aus den Perithezien herausragten. Unter dem Stereomikroskop wurden die Petrischalen mit der Nikon Digital Slight DS-U3 fotografiert. Danach wurden Asci mit einer Präpariernadel geerntet und in ein Mikroreaktionsgefäß mit 100 μ l PD-Medium überführt. Der Inhalt der Mikroreaktionsgefäße wurde vorsichtig im PD-Medium mithilfe der Präpariernadel durchmischt. Danach wurden 10 μ l dieser Ascosporen-Suspension auf einen Objektträger pipettiert, unter dem Lichtmikroskop betrachtet und fotografiert. Nach etwa 2 h Inkubation bei RT keimten die Ascosporen in der Suspension. Von diesen wurden erneut 10 μ l auf einen Objektträger pipettiert, unter dem Lichtmikroskop betrachtet und fotografiert.

3.4 Infektionsexperimente

Die für die Infektionsexperimente benötigten Makrokonidien wurden, wie unter Punkt 3.1.1.2 beschrieben erzeugt, geerntet und ausgezählt. Anschließend wurde die Suspension auf eine Konzentration von 1×10^6 Sporen/ml in 0,02 % Tween20 eingestellt.

3.4.1 Inokulation der Stängel von vorverwundeten Maispflanzen

Für den Stängel-Infektionstest wurde die Maissorte Golden Jubilee (siehe 3.1.3.1) verwendet. Die Anzucht- und Haltungsbedingungen sind unter Punkt 3.1.3.2 aufgeführt. Die Töpfe mit den fünf bis sechs Wochen alten Pflanzen wurden in eine horizontale Stellung gebracht und unter Zuhilfenahme eines mit 100 % Ethanol sterilisierten Nagels (\varnothing 2 mm) wurde ein etwa 0,4 mm tiefes Loch in die Mitte des ersten Internodiums gebohrt. In dieses wurden 10 μ l der jeweiligen Konidien-Suspension bzw. im Falle der Kontrolle 0,02 % Tween20 pipettiert. Die Inokulationsstelle wurde mit Parafilm (Bemis Company, Neenah, USA) umwickelt, um die benötigte Feuchtigkeit zu gewährleisten. Die Pflanzen wurden, wie zuvor im Gewächshaus kultiviert und nach einer Woche wurde der Parafilm entfernt. Nach 10 Tagen wurden die inokulierten Internodien mit einer Gartenschere aus den Stängeln

herausgeschnitten. Mit einem Messer wurden die Stängel mittig durch die Inokulationsstelle längs halbiert. Die halbierten Stängelsegmente wurden mit einer Nikon Digital Sight DS-Fi1 fotografisch dokumentiert. Für die Kalkulation der nekrotisierten Flächen beider Stängelhälften in mm² wurde mit der Software Fiji (Fiji Is Just ImageJ, ImageJ Version: v1.51; Schindelin et al., 2012) gearbeitet. Das Experiment wurde in drei biologischen Wiederholungen mit jeweils acht inokulierten Stängeln (= technische Wiederholungen) pro Variante durchgeführt. Zur statistischen Auswertung erfolgte eine Normalisierung auf den Wildtyp Stamm NRRL 13383.

3.4.2 Inokulation der Blütchen von Weizenpflanzen

Für die Infektion von Weizenpflanzen wurde die Sorte Sonett (siehe 3.1.3.1) verwendet. Die Anzucht- und Haltungsbedingungen vor und nach der Inokulation sind unter Punkt 3.1.3.2 ausgeführt. Die für die Experimente benötigten sieben bis acht Wochen alten Weizenpflanzen befanden sich im Entwicklungsstadium der Blüte mit einem BBCH-Code von etwa 65. Das bedeutete, dass circa 50 % der Antheren reif waren und die Mitte der Blühperiode erreicht war. Bei Ähren, die dieses Kriterium erfüllten, wurden 10 µl der Konidien-Suspension bzw. der Kontrolle in das neunte äußere Ährchen (von oben gezählt) pipettiert. Zu diesem Zweck wurden Hüll- und Deckspelze vorsichtig abgespreizt, bevor die Inokulation erfolgte. Es wurde darauf geachtet, keine Gewebe mit der Pipettenspitze zu berühren. Das Experiment wurde in drei biologischen Wiederholungen mit jeweils 27 inokulierten Ähren (= technische Wiederholungen) pro Variante durchgeführt. Die Bonitur der Symptome erfolgte nach 3, 5, 7, 9 und 11 dpi. Dabei wurde die Anzahl an Blütchen notiert, welche Verbräunungen aufwiesen. Am Versuchsende wurde die Gesamtanzahl aller gebildeten Blütchen jeder Ähre gezählt. Die Angabe der befallenen Blütchen konnte auf diese Art und Weise in Prozent erfolgen. Außerdem wurden an Tag 11 alle Ähren mit der Nikon Digital Sight DS-Fi1 fotografiert.

3.4.3 Inokulation von mit Fungizid vorbehandelten Weizenähren

Im Unterschied zu der bereits beschriebenen Inokulation der Blütchen von Weizenpflanzen wurde bei diesem Test zwei Tage bevor die Weizenpflanzen der Sorte Sonett das Entwicklungsstadium der Blüte mit einem BBCH-Code von etwa 65 erreicht hatten, das Fungizid Ballet appliziert. Dies sollte eine Feldanwendung bei vorhandenem Infektionsdruck simulieren. Zwei Tage später erfolgte die Inokulation wie bereits beschrieben (siehe 3.4.2). Das Handelspräparat Ballet (Bayer CropScience) enthält den Wirkstoff Tebuconazol mit einem Wirkstoffgehalt von 250 g/l. Die Anwendung erfolgte mit Hilfe eines Hand-Drucksprühers (Gloria-Werke, Wadersloh, DE), der in einem Abstand von circa 50 cm über den Weizenpflanzen bewegt wurde. Hierzu wurden 2 ml Ballet in einem Gesamtvolumen von 1 l H₂O verdünnt, wovon 233 ml pro m² Weizenpflanzenbestand versprüht wurden. Dabei handelt es sich

um eine höhere Endkonzentration als von Bayer empfohlen. Die Anzucht- und Haltungsbedingungen vor wie nach der Inokulation sind unter Punkt 3.1.3.2 ausgeführt.

3.5 Ermittlung der Fungizidsensitivität

3.5.1 Bestimmung der ED50- und ED90-Werte

Zur quantitativen Bestimmung der Toleranz gegenüber Fungiziden wurden Petrischalen mit je 30 ml PDA-Medium mit dem entsprechenden Wirkstoff gefüllt. Als Fungizide wurden Tebuconazol (Reinheitsgrad $\geq 98\%$) und Epoxiconazol (Reinheitsgrad $\geq 95\%$) verwendet. Beide wurden als Pulver von der Firma LKT Laboratories Inc. (Saint Paul, USA) bezogen, in Aceton gelöst und autoklaviertem PDA in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt. Damit die Konzentration des Lösungsmittels in allen Petrischalen gleich war, wurde auch den Kontroll-Petrischalen ohne Fungizidzusatz die entsprechende Menge an Aceton hinzugefügt. Daher enthielten alle Medien eine Acetonkonzentration von 0,2 %. Tebuconazol wurde in den folgenden Konzentrationen verwendet: 0 / 0,01 / 0,05 / 0,1 / 0,5 / 1 / 2,5 / 3,75 / 5 / 7,5 / 10 / 12,5 / 15 und 20 $\mu\text{g/ml}$. In den Experimenten mit Epoxiconazol wurden zusätzlich 40 $\mu\text{g/ml}$ verwendet. Für jedes Isolat und jede Wirkstoffkonzentration wurden drei technische Wiederholungen durchgeführt. Die vorbereiteten Petrischalen wurden bis zu dem Zeitpunkt der Inokulation im Dunkeln bei RT gelagert. Die Inokulation erfolgte mittig mit je 10 μl einer 1×10^6 Makrokonidien/ml enthaltenden Suspension (siehe 3.1.1.2). Die Petrischalen wurden in Plastiktüten gestapelt und diese mit Klebeband so verschlossen, dass noch etwas Luftaustausch mit der Umgebung möglich war. Anschließend wurden die Petrischalen bei 25 °C im Dunkeln inkubiert. Im Fall von Tebuconazol wurden die Petrischalen nach 4, 5 und 10 dpi mit der Nikon Digital Sight DS-Fi1 fotografiert. Im Fall von Epoxiconazol nach 4, 8 und 12 dpi. Für die Berechnung der bewachsenen Fläche wurde die Software Fiji (Fiji Is Just ImageJ, ImageJ Version: v1.51; Schindelin et al., 2012) verwendet. Die statistische Bestimmung der ED₅₀- und ED₉₀-Werte ist unter Punkt 3.7.3 ausgeführt.

3.5.2 Bestimmung der Fungizidresistenz in Mikrotiterplatten

Zur semiquantitativen Erfassung der Toleranz gegenüber Fungiziden im Hochdurchsatz wurde der s.g. Resazurintest im 96er Mikrotiterplattenformat durchgeführt. Neben Tebuconazol und Epoxiconazol (s.o.), wurden neun weitere Fungizide verwendet: Prothioconazol ($\geq 99\%$), Metconazol ($\geq 99,8\%$), Cyproconazol ($\geq 98,5\%$), Prochloraz ($\geq 99,4\%$), Spiroxamin ($\geq 98,4\%$), Thiophanat-methyl ($\geq 98,9\%$), Fluoxastrobin ($\geq 99,3\%$), Iprodion ($\geq 99,8\%$) und Bixafen ($\geq 99,7\%$). Diese Fungizide wurden pulverförmig von der Firma Dr. Ehrenstorfer GmbH (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, DE) bezogen. Neben den Azol-Wirkstoffen Tebuconazol, Epoxiconazol, Prothioconazol, Metconazol, Cyproconazol

und Prochloraz wurden hiermit fünf weitere Fungizidklassen abgedeckt. Thiophanate-methyl (Code: B1) gehört zur Wirkstoffgruppe der Thiophanate, welche wiederum bei den MBC (Methyl Benzimidazol Carbat) -Fungiziden eingeordnet werden, deren molekulares Ziel das β -Tubulin ist. Spiroxamin (Code: G2) inhibiert zwar ebenfalls wie die bereits erwähnten DMI-Fungizide die Sterolbiosynthese, gehört aber nicht zur SBI (Sterolbiosyntheseinhibitor) -Klasse I sondern zur SBI-Klasse II, da seine molekularen Wirkorte andere Enzyme dieses Syntheseweges sind, d.h. die Sterol- Δ^{14} -Reduktase und die Sterol- $\Delta^{8/7}$ -Isomerase. Spiroxamin gehört der chemischen Gruppe der Morpholine an. Bixafen (Code: C2) gehört zu den SDHI (Succinat Dehydrogenase) Inhibitoren und dort zur Wirkstoffgruppe der Pyrazol-4-carbonsäureamide. Das molekulare Ziel von Bixafen ist die Succinat Dehydrogenase, was zu einer Inhibierung des mitochondrialen Elektronentransfers von Succinat auf Ubiquinon führt. Bei Fluoxastrobin (Code: C3) handelt es sich um ein Strobilurin bzw. QoI (Quinone outside Inhibitor) -Fungizid, welches zur Wirkstoffgruppe der Methyl-Acrylate gehört und die Cytochrom-c-Reduktase an der Qo-Stelle angreift. Iprodion (Code: E3) gehört zu den Dicarboximiden und hat als molekulares Ziel MAP-Kinasen (os-1, Daf-1) in bestimmten Signalketten. Iprodion ist in der Europäischen Union seit 2018 nicht mehr zugelassen.

Für alle Fungizide wurde Aceton als Lösungsmittel verwendet. Die folgenden Endkonzentrationen wurden im Experiment für die einzelnen Wirkstoffe verwendet und waren zuvor in eigenen Vorexperimenten optimiert worden:

Tebuconazol	0 / 2,5 / 5 / 7,5 / 10 / 20 / 30 und 60 $\mu\text{g/ml}$
Epoxiconazol	0 / 2,5 / 5 / 7,5 / 10 / 20 / 30 und 40 $\mu\text{g/ml}$
Prothioconazol	0 / 0,25 / 0,5 / 1 / 1,5 / 2 / 2,5 und 5 $\mu\text{g/ml}$
Metconazol	0 / 0,25 / 0,5 / 1 / 1,5 / 2 / 2,5 und 5 $\mu\text{g/ml}$
Cyproconazol	0 / 40 / 60 / 80 / 100 / 130 / 160 und 190 $\mu\text{g/ml}$
Prochloraz	0 / 0,25 / 0,5 / 0,75 / 1 / 2 / 3 und 5 $\mu\text{g/ml}$
Spiroxamin	0 / 40 / 60 / 80 / 100 / 130 / 160 und 190 $\mu\text{g/ml}$
Thiophanat-methyl	0 / 2,5 / 5 / 7,5 / 10 / 20 / 30 und 40 $\mu\text{g/ml}$
Fluoxastrobin	0 / 40 / 60 / 80 / 100 / 130 / 160 und 190 $\mu\text{g/ml}$
Iprodion	0 / 40 / 60 / 80 / 100 / 130 / 160 und 190 $\mu\text{g/ml}$
Bixafen	0 / 40 / 60 / 80 / 100 / 130 / 160 und 190 $\mu\text{g/ml}$

Von jedem Wirkstoff wurde zunächst eine Stammlösung von 100 mg/ml in Aceton hergestellt. Davon ausgehend wurden für jeden Wirkstoff die acht benötigten Verdünnungen hergestellt. Die Berechnung war so gestaltet, dass innerhalb eines Wirkstoffes aus jeder der acht Verdünnungen immer das gleiche Volumen entnommen werden und in SDB-Medium (siehe 8.4.1) pipettiert werden konnte. Damit die

Konzentration des Lösungsmittels in allen 96 Löchern gleich war, wurde auch den Kontrollen ohne Fungizidzusatz die entsprechende Menge an Aceton zugefügt, so dass stets eine Acetonkonzentration von 0,2 % vorlag. In den Löchern befanden sich 190 µl SDB-Medium eingestellt auf den jeweils benötigten Wirkstoffgehalt, welches mit jeweils 10 µl einer 1×10^6 Makrokonidien/ml enthaltenden Suspension (siehe 3.1.1.2) inokuliert wurde. Die Mikrotiterplatten wurden mit Parafilm verschlossen und bei 25 °C für 3 d im Dunkeln inkubiert. Am Tag drei wurden in jedes Loch 10 µl Resazurin (2mg/ml) gegeben und die Platte für einen weiteren Tag wie oben beschrieben inkubiert. Bei Resazurin handelt es sich um einen blauen bis violett Farbstoff, der bei Reduktion zu dem pink- bis rosafarbenen Resorufin umgesetzt wird und bei weiterer Reaktion zu dem farblosen Dihydroresorufin reduziert wird (Twigg, 1945). In dieser Arbeit bedeutete der Farbton blau/violett keine Keimung und kein Wachstum, der Farbton pink bis weiß hingegen Keimung bis starkes Hyphenwachstum und somit metabolische Aktivität. Nach 4 dpi wurde jede Platte mit der Nikon Digital Sight DS-Fi1 fotografiert. Jeder Wirkstoff wurde auf einer Mikrotiterplatte mit acht Konzentrationen an zehn verschiedenen Isolaten getestet. Zusätzlich wurde jeweils ein Loch pro Konzentration nicht inokuliert und diente als Negativkontrolle. Das Experiment wurde für jedes Fungizid mit mindestens 3 biologischen und jeweils 2 technischen Wiederholungen durchgeführt.

3.6 Bestimmung der *in vitro* Mykotoxinproduktion

Die Mykotoxinanalysen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Professor Petr Karlovsky an der Georg-August-Universität in Göttingen durchgeführt. Ziel der Analyse war es, zu ermitteln, ob sich die Mykotoxinproduktion zwischen den hier erzeugten Mutanten und der WT-Referenz unterscheidet. Zu diesem Zweck wurde Reismedium mit 100 µl einer 1×10^6 Makrokonidien/ml enthaltenden Suspension (siehe 3.1.1.2) inokuliert und bei 21 °C für drei Wochen im Dunkeln ohne Schütteln inkubiert. Zur Herstellung des Reismediums wurden 4,5 g getrockneter Bio-Langkorn-Reis mit 9 ml Leitungswasser in einem 100 ml Erlenmeyerkolben autoklaviert. Pro Isolat wurden fünf Kolben angeimpft. Nach drei Wochen wurde die Reiskultur mit 45 ml Lösungsmittel (84/16 Acetonitril/Wasser mit 1 % Essigsäure) bei RT über Nacht (ü. N.) schüttelnd extrahiert. 15 ml des Extraktes wurden bei 4500 rpm und RT für 10 min zentrifugiert. Es wurden 100 µl des Überstandes entnommen und in 900 µl H₂O_{Bidest} (Sartorius arium pro, Göttingen, DE) aufgenommen. Nach zweimaliger Zentrifugation bei 13400 rpm für jeweils 10 min wurde der erhaltene Überstand in ein HPLC-Gefäß überführt. Im Anschluss erfolgte die Trennung des Substanzgemisches sowie die Identifizierung und Quantifizierung der Mykotoxine mit dem Agilent 1290 Infinity II HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) und dem daran gekoppelten 6460 Agilent Triple Quadrupole LC/MS (*Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*; Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Zur HPLC wurde die Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 Trennsäule

(stationäre Phase) mit 1,8 µm Partikelgröße, 100 mm Länge und 2,1 mm Durchmesser bei einer Temperatur von 40 °C verwendet (Umkehrphasenchromatographie). Auf die Trennsäule wurden 5 µl injiziert. Die Flussrate betrug 400 µl/min. Es wurden zwei Lösungsmittel (Eluenten, mobile Phase) in einem Lösungsmittelgradienten bestehend aus 0,1 % Ameisensäure in Wasser (A) und 0,1 % Ameisensäure in Methanol (B) verwendet.

Schema des Lösungsmittelgradienten:

Zeit [min]	% A	% B
0,2	95	5
7,5	66	34
7,55	66	34
10	2	98
11	2	98
11,2	95	5
14	95	5

Bei der durchgeführten Gradientenelution wurde die Polarität des Substanzgemisches in der mobilen Phase während der Analyse verändert. Zuerst lösten sich nur die Stoffe von der Säule, die kaum mit dieser wechselwirkten. Je höher der Gehalt an Methanol wurde, desto besser lösten sich wechselwirkende Stoffe von der Säule. Die eluierten Verbindungen wurden mit einem Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS detektiert. Dabei wurden je zwei Massenübergänge pro Toxin zur sicheren Identifizierung verwendet. Die Kalibrierung der Anlage erfolgte mit deuterierten Referenzsubstanzen für 3-ADON, 15-ADON, DON, NIV und ZEA. Die Schätzung der Nachweisgrenzen (*limit of detection* (LOD) + *limit of quantification* (LOQ)) erfolgte in Anlehnung an ein von der Europäischen Union veröffentlichtes Dokument (Wenzl et al., 2016).

Nachweisgrenzen der Mykotoxine im durchgeführten Experiment in mg/kg:

	<u>DON</u>	<u>3-ADON</u>	<u>15-ADON</u>	<u>NIV</u>	<u>ZEN</u>
LOD	0,1	1,3	0,1	0,1	0,1
LOQ	0,5	4,9	0,5	0,5	0,5

3.7 Statistische und Bioinformatische Analysen

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden in mindestens drei biologischen Wiederholungen durchgeführt. Die Anzahl der technischen Wiederholungen variierte je nach Experiment, beinhaltete aber immer mindestens drei. Zusätzlich wurde bei allen Experimenten, wenn möglich, randomisiert. Dies betraf Positionsveränderungen von Kolben und Petrischalen in Inkubatoren, aber auch von Pflanztopfen in Klimaschränken.

3.7.1 *In silico* Analysen

Die Microsoft Office Programme Excel, PowerPoint und Word wurden für die Datenverwaltung, -auswertung und -darstellung verwendet. Statistische Signifikanzen wurden unter Verwendung des t-Test ($p < 0,05$) ermittelt und sind in den Abbildungen mit einem Sternchen gekennzeichnet. Clone Manager 9 wurde für das Entwerfen von Klonierungen und Oligonukleotiden, die Erstellung von Restriktionskarten sowie für Sequenzvergleiche verwendet. Die Datenbank EnsemblFungi wurde unter Verwendung des *F. graminearum* str. PH-1 Genoms für sämtliche Genomanalysen einschließlich von Domänenvorhersagen genutzt (https://fungi.ensembl.org/Fusarium_graminearum/Info/Index). Zwei verschiedene Programme wurden für DNA und Proteinvergleichen im Rahmen der Suche nach orthologen und paralogen Genen in andere Organismen verwendet (https://fungi.ensembl.org/Fusarium_graminearum/Tools/Blast und <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Die Funktion BioMart wurde für die *GO-term* Analyse und die *KEGGS pathway* Analyse angewendet (<https://fungi.ensembl.org/biomart/martview/d9ab52d738953b262f6bd79d70901f62>). Die Software YLoc diente der Vorhersage der subzellularen Lokalisation (<https://abi-services.cs.uni-tuebingen.de/yloc/webloc.cgi?id=014f586b853b4e6d2db9f73ab481c752>).

3.7.2 Phylogenetische Analyse

Die ersten Homologievergleiche und die Downloads der Proteinsequenzen erfolgten unter Verwendung von EnsemblFungi BLAST (https://fungi.ensembl.org/Fusarium_graminearum_ph_1_gca_000240135/Tools/Blast?g=FGSG_03292;r=2:7316721-7319054;t=ESU09956) und NCBI blastp (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blast_home). Der Maximum-likelihood Stammbaum für das Protein Azr1 von *F. graminearum* und dessen Orthologe aus ausgewählten filamentösen Pilzen wurde im weiteren unter Verwendung der Software MEGAX (<https://www.megasoftware.net/>) erstellt. Zuvor wurde das Alignment unter Verwendung der Software BioEdit Sequence Alignment Editor (<https://bioedit.software.informer.com/7.2/>) mit manueller Optimierung durchgeführt. Dazu wurden die Proteine in voller Länge verwendet. In der Software MEGAX wurde das Substitutionsmodell WAG-Matrix verwendet. Im Rahmen der durchgeführten Bootstrap Analyse wurden 1000 Pseudoreplikate erstellt. Die folgenden Pilze, mit Angabe der verwendeten Genomannotation, wurden in der phylogenetischen Analyse berücksichtigt: *Fusarium graminearum* str. PH-1 RR1; *Fusarium culmorum* UK99 EF1; *Fusarium pseudograminearum* (GCA_000303195.1); *Fusarium oxysporum* (GCA_900096695); *Verticillium longisporum* (GCA_001268165); *Colletotrichum graminicola* M1_001_V1; *Colletotrichum orbiculare* GCA_000350065.1; *Colletotrichum gloeosporioides* Cg-14 (GCA_000446055); *Colletotrichum higginsianum* IMI 349063 (GCA_001672515); *Neonectria ditissima*

str. R09/05 (GCA_001306435); *Trichoderma reesei* RUT C-30 (GCA_000513815); *Metarhizium rileyi* RCEF 4871 (GCA_001636745); *Acremonium chrysogenum* ATCC 11550 (GCA_000769265); *Drechmeria coniospora* str. ARSEF 6962 (GCA_001625195); *Escovopsis weberi* (GCA_001278495) ; *Cordyceps confragosa* RCEF 1005 (GCA_001636795); *Stachybotrys chlorohalonata* IBT 40285 (GCA_000732775); *Magnaporthe oryzae* MG8; *Botrytis cinerea* BcDW1 (GCA_000349525); *Zymoseptoria tritici* ST99CH_1E4 (GCA_900184115); *Aspergillus flavus* AF70 (GCA_000952835); *Puccinia graminis* ASM14992v1; *Ustilago maydis* Umaydis521_2.0; *Saccharomyces cerevisiae* (GCA_002804325); *Blumeria graminis f. sp. tritici* 96224 (GCA_000418435).

3.7.3 Bestimmung der ED-Werte

Für die Bestimmung der ED50 und ED90 Werte wurde das durchschnittlich gemessene Flächenwachstum des Myzels verwendet (siehe 3.3.2). Auf Basis dieser Werte wurden die, für eine 50 %ige und eine 90 %ige Wachstumshemmung notwendigen effektiven Dosen berechnet. Zu diesem Zweck wurde als erstes der Logarithmus zur Basis 10 für alle verwendeten Wirkstoffkonzentrationen berechnet. Daran anschließend wurde das durchschnittliche Myzelwachstum jeder Variante zunächst in Prozent im Verhältnis zur jeweiligen Nullkontrolle ausgedrückt, um darauf aufbauend schließlich den Wirkungsgrad bzw. die Effizienz zu berechnen. Im Anschluss wurde folgende Formel angewendet: $\text{Logarithmisch transformierte Effizienz} = \ln(0,01 \cdot \text{Wirkungsgrad} / (1 - 0,01 \cdot \text{Wirkungsgrad}))$.

Aufgrund der Tatsache, dass einige der Isolate bei den höheren Konzentrationen keine Keimung bzw. kein Wachstum zeigten, konnten für die Berechnung der ED50 und ED90 Werte im Fall von Tebuconazol nur die Konzentrationen von 0,01 bis 5 µg/ml und im Fall von Epoxiconazol nur die Konzentrationen von 0,01 bis 7,5 µg/ml herangezogen werden. Dieser Umstand führte dazu, dass die ED-Werte nur im Rahmen dieser Konzentrationsbereiche aussagefähig sind. Für jedes Isolat wurde unter Anwendung der linearen Regression das Verhältnis zwischen dem Logarithmus zur Basis 10 der, für die Berechnung der ED-Werte herangezogenen, Wirkstoffkonzentrationen und dem natürlichen Logarithmus der Wirkungsgrade für diesen Bereich dargestellt. Auf dieser Basis erfolgten die Aufstellung der Gleichung der linearen Regression und die Bestimmung des Bestimmtheitsmasses. Unter Verwendung der weiter oben genannten Formel konnten dann die y-Werte für eine 50 %ige und eine 90 %ige Wachstumshemmung berechnet und nach Umstellung der, für jedes Isolat erhaltenen Gleichungen nach x, in diese eingesetzt werden. Die dabei erhaltenen Werte wurden mit 10 multipliziert und resultierten in den hier angegebenen ED-Werten. Die gesamte beschriebene Kalkulation erfolgte mit Microsoft Excel und war im Vorgehen an Kunz et al., 1997 angelehnt.

3.8 Mikroskopie

Die Hellfeldmikroskopie wurden an einem Eclipse E600 Forschungsmikroskop (Nikon, Düsseldorf, DE) unter Verwendung der folgenden Objektive durchgeführt:

- Nikon Japan, Plan Fluor 10x/0.3 DIC L ∞ /0.17 WD 16.0
- Nikon Japan, Plan Fluor 20x/0.50 DIC M ∞ /0.17 WD 2.1
- Nikon Japan, Plan Fluor 40x/0.75 DIC M ∞ /0.17 WD 0.72
- Nikon Japan, Plan Fluor 60x/1.40 Oil DIC H ∞ /0.17 WD 0.2
- Nikon Japan, Plan Fluor 100x/1.30 Oil DIC H ∞ /0.17 WD 0.2

Das verwendete Okular hatte eine 10fache Vergrößerung. Als Öl wurde das Immersion Öl für die Mikroskopie 50cc vom Type NF der Firma Nikon verwendet. Des Weiteren wurde das Stereomikroskop SMZ800 der Firma Nikon verwendet. Als Lichtquelle wurde für das Stereomikroskop ein intraluxTM 5000-1 mit zwei flexiblen Lichtleitern der Firma Volpi AG (Schlieren, CH) verwendet. Alle Bilder wurden mit der digitalen Mikroskopkamera Digital Slight DS-U3 der Firma Nikon aufgenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Der Transkriptionsfaktor Azr1

4.1.1 Struktur und Vorhersage der Funktion von FgAZR1

Das aus *in vitro* Adaptionsexperimenten hervorgegangene Isolat P1-11 weist im Vergleich zum Wildtypisolat NRRL 13383 eine signifikant höhere Toleranz gegenüber Azol-Fungiziden auf (Becher et al. 2010). In einer Vorläuferarbeit wurden die Genome von NRRL 13383 und P1-11 sequenziert (Tryono et al., unveröffentlicht). Im Vergleich zum Wildtypisolat zeigte P1-11 mehrere Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) auf, von denen einige zu synonymen Aminosäureaustauschen führten, andere in nicht-codierenden Bereichen lagen und aus diesen Gründen aussortiert wurden. Von den verbleibenden SNPs ragte einer heraus, da er zu einem nicht-synonymen Aminosäureaustausch in einem zuvor nicht charakterisierten Transkriptionsfaktor führt. Die Locusbezeichnung für das hier als *AZR1* (Azol Resistenz 1) benannte Transkriptionsfaktorgen lautet in der Annotation des Rothamsted Research Institute FGRAMPH1_01G12517 (King et al. 2015) und nach der früheren FG3 Annotation vom Broad Institute FGSG_03292 (https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/GCA_000240135). Das Gen *AZR1* befindet sich zentral gelegen auf dem zweiten *F. graminearum* Chromosom des Referenzisolates PH-1, lokalisiert von Basenpaar 4,735,992 bis 4,738,361. Es umfasst 2169 bp und beinhaltet 4 Exons und 3 Introns. Das Protein besteht aus 722 Aminosäuren (AS) (Abb. 5). Das Programm EnsemblFungi stellt die im Folgenden aufgezählten Domänen- und *Feature*-Vorhersagen anderer Methoden gebündelt dar. Die Methode MobiDB-lite sagt am N-Terminus von Azr1 (AS 1 bis 21) eine sogenannte *long intrinsically disordered region (IDR)* vorher. Diesen Regionen mangelt es an einer festgelegten oder geordneten dreidimensionalen Struktur. Darauf folgend wird eine Zn(2)-C6 pilztypische DNA-bindende Domäne (InterPro:IPR001138) vorhergesagt, die dem Typ der Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren entspricht und sich vom Ende des ersten Exons des Gens bis in den Anfang des zweiten Exons von *AZR1* erstreckt. Diese ist vermutlich für die Erkennung der Bindestelle im Promotor verantwortlich. Je nach verwendeter Methode variieren die Angaben der exakten Lokalisation dieser Domäne (Superfamily: AS 24 bis 67; SMART: AS 25 bis 68; CDD: AS 30 bis 58; PROSITE profiles: AS 30 bis 58; Pfam: AS 30 bis 59; Gene3D: AS 29 bis 108). Direkt daran anschließend (AS 72 bis 92), sagt die Methode Ncoils ein sogenanntes *coiled coil motif* voraus. Ein weiteres dieser Motive befindet sich zwischen den Aminosäuren 459-479. Diese Motive sollen α -Helices anzeigen, die schraubenförmig umeinandergewunden sind. Derartige Strukturen erkennen spezifische DNA-Sequenzen. Die Transkriptionsfaktor Domäne von Azr1 (Pfam: AS 212-409; SMART: AS 323-396), in welcher der SNP lokalisiert ist, befindet sich in Exon 3 und 4 von *AZR1*. Diese Domäne findet sich in einer Reihe von

Transkriptionsfaktoren, die zelluläre und metabolische Prozesse regulieren und sie beinhaltet Bindestellen für andere Proteine wie z.B. transkriptionelle Co-Regulatoren. Die Software YLoc sagt die Lokalisation von Azr1 im Nukleus mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,71 % vorher.

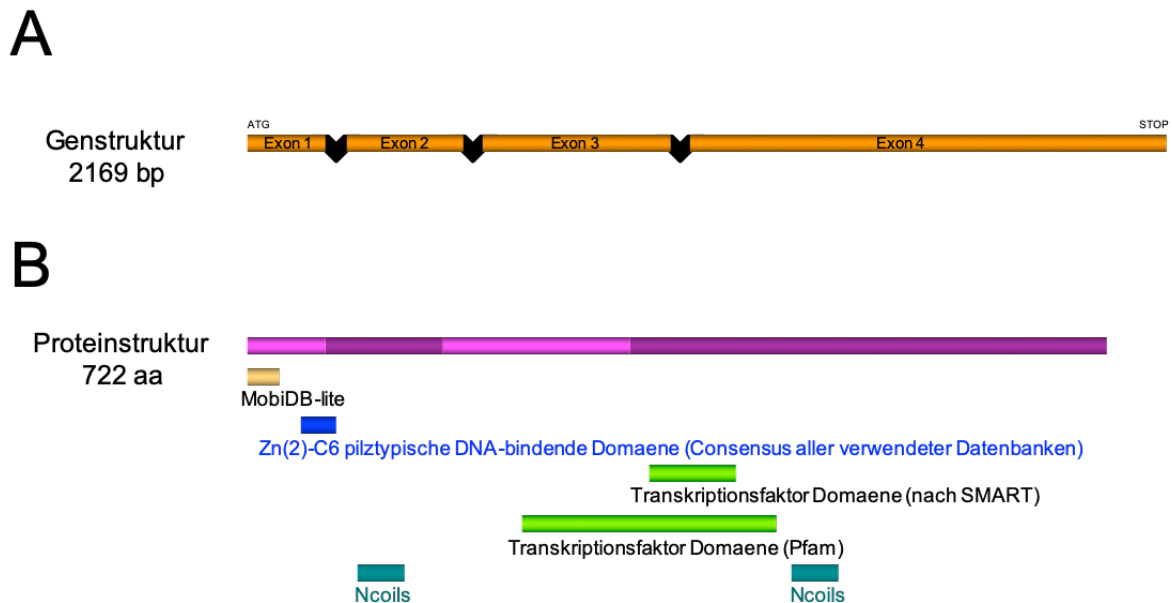


Abbildung 5: Darstellung der Gen- und Proteinstruktur des Azr1 Transkriptionsfaktors inklusive der Lokalisierung vorhergesagter Domänen (nach EnsemblFungi).

- (A) Genstruktur. Exons in *AZR1* sind in orange und Introns in schwarz dargestellt. Der gesamte ORF hat eine Länge von 2169 bp.
- (B) Proteinstruktur inklusive Lokalisierung vorhergesagter Domänen. Die Lokalisierung der Zn(2)-C6 pilztypischen DNA-bindenden Domäne (blau) stellt die minimale Domänenausdehnung dar, welche den Vorhersagen von sechs unterschiedlichen Methoden gemein war. Azr1 besteht aus 722 Aminosäuren.

4.1.2 Azr1 ist am stärksten innerhalb der Gattung *Fusarium* konserviert

Bei Azr1 aus *F. graminearum* und seinen Orthologen aus anderen Pilzen handelt es sich um einen bisher uncharakterisierten Transkriptionsfaktor. Blast-Analysen unter Verwendung der Azr1 Proteinsequenz zeigten, dass FgAzr1 besonders innerhalb der *Fusarium*-Arten mit einer Identität von über 90 % sehr stark konserviert ist (Abb. 6). Am höchsten ist diese Übereinstimmung bei Monokotyle infizierenden *Fusarium*-Arten. Mit Hilfe von Blast-Analysen unter Einbeziehung unterschiedlicher Vertreter aus verschiedenen Taxa der Ascomycota und der Basidiomycota, zeigte sich, dass alle anderen putativen Orthologen mit weniger als 50 % Identität eine sehr geringe Identität zu FgAzr1 aufweisen. So weisen die orthologen Proteine von *Colletotrichum*-Arten und *Verticillium longisporum* lediglich eine Identität von 43 % mit FgAzr1 auf. Interessanterweise wurden besonders in Pilzen mit teils saprophytischer Lebensweise (*Fusarium*-, *Colletotrichum*-, *Acremonium*-, *Verticillium*-,

Metarhizium-, *Cordyceps*-, *Trichoderma*-, *Neonectria*-, *Escovopsis*-, *Stachybotrys*-Arten) Azr1-Orthologe identifiziert. Dabei ist hervorzuheben, dass es sich unter anderem bei *Fusarium*-, *Colletotrichum*-, *Trichoderma*-, *Escovopsis*- und *Stachybotrys*-Arten um bekannte Produzenten toxischer Sekundärmetabolite handelt (Kim and Shim 2019; Al-Fakih 2014; Došen et al. 2016; Dhodary et al. 2018).

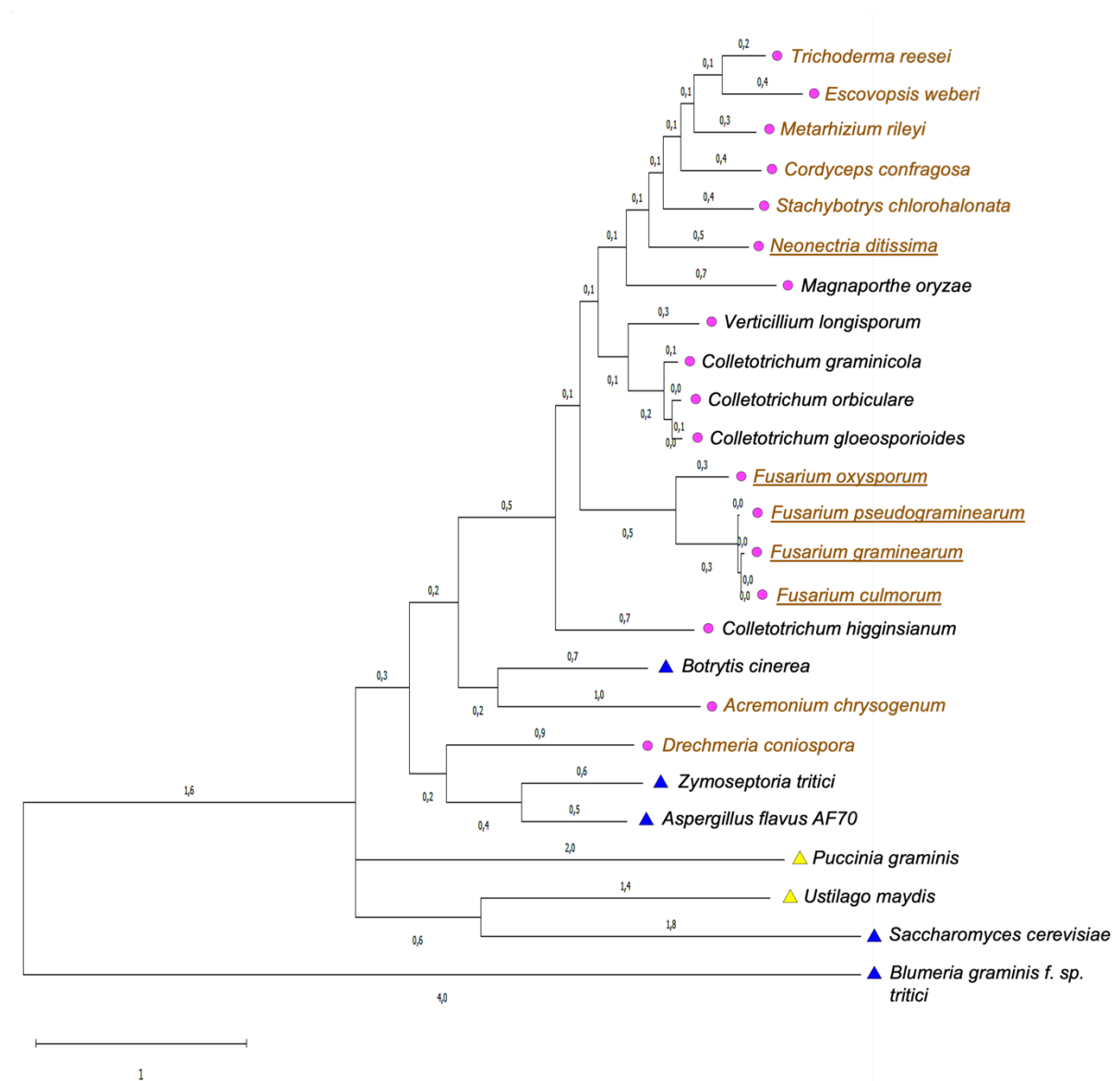


Abbildung 6: Azr1 ist innerhalb der Gattung *Fusarium* stark konserviert und zeigt zusätzlich deutliche Ähnlichkeiten zu den Orthologen von *Colletotrichum* spp.

Das Phylogram für das Protein Azr1 von *F. graminearum* und dessen Orthologe aus verschiedenen Asco- und Basidiomycota wurde mit dem Programm MEGAX erzeugt. Ascomycota, welche zu der Klasse der Sordariomycetes gehören, sind mit einem pinken Kreis gekennzeichnet. Ascomycota anderer Klassen sind mit einem blauen Dreieck und die Basidiomycota mit einem gelben Dreieck gekennzeichnet. Innerhalb der Sordariomycetes wurden Pilze der Ordnung Hypocreales in brauner Schrift gehalten und Vertreter aus der Familie der Nectriaceae zudem unterstrichen. Der Stammbaum ist maßstabsgetreu und wurde mit *Blumeria graminis f. sp. tritici* gewurzelt. Die Kantenlänge repräsentiert die Anzahl an Substitutionen.

4.1.3 Erzeugung von AZR1 Deletions-, Allelaustausch- und Kontrolltransformatanten für die funktionale Analyse von Azr1

Um sowohl die Funktion von Azr1 im Allgemeinen als auch die alleinigen Auswirkungen des im AZR1 Gen vorhandenen Einzelnukleotid-Polymorphismus analysieren zu können, wurden in dieser Arbeit vier Konstrukte erzeugt. In allen Fällen erfolgte die Integration des jeweiligen Konstruktes über homologe Rekombination am Ziellocus.

Im Fall der Deletion des nativen AZR1 Gens wurde der gesamte ORF deletiert und gegen eine Deletionskassette ausgetauscht, welche unter Verwendung der *Double-Joint*-PCR hergestellt wurde. Die Deletionsmutanten wurden als $\Delta azr1$ Stämme bezeichnet. Die Deletionskassette bestand aus dem *nat1* Resistenzgen (Nourseothricin-Acetyltransferase; (Malonek et al. 2004)) aus *Streptomyces noursei* unter der Kontrolle des *oliC* Promotors aus *Aspergillus nidulans*, welches 5' und 3' von etwa 1000 bp großen Flanken umgeben war. Die 5'-Flanke bestand aus der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) bis zum Beginn des AZR1 Startcodons, wohingegen die rechte Flanke, die 3'-untranslatierte Region, aus der Sequenz ab dem AZR1 Stopcodon bestand (Abb. 7A).

Im Fall des Allelaustauschkonstruktes (*azr1*^{S368Y}) wurde der ORF des AZR1 Gens des NRRL 13383 Wildtypalleles gegen den AZR1 ORF des P1-11 Alleles ausgetauscht. Letzterer enthält einen Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) in AZR1, der zum S368V-Aminosäureaustausch führt. Der Stamm P1-11 ist ein Azol tolerantes Isolat, welches nach einer einmonatigen Adaptation an eine subletale Dosis von Tebuconazol erhalten und anschließend charakterisiert worden war (Becher et al. 2010). Zum Zweck der späteren besseren Selektierbarkeit erfolgreicher Transformationsereignisse, wurde an den ORF von P1-11 zunächst der *Tnos* Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens* fusioniert, gefolgt von dem *hph* Resistenzgen (Hygromycin Phosphotransferase) aus *Streptomyces hygroscopicus* unter der Kontrolle des *gpdA* Promotors aus *A. nidulans*. Auch in diesem Fall enthält das Konstrukt zusätzlich noch am Anfang und am Ende anfusionierte DNA-Fragmente des AZR1 Gens des Wildtypstammes, welche jeweils 1000 bp des 5'UTR bzw. des 3'UTR umfassen (Abb. 7A). Beide der bisher beschriebenen Konstrukte wurden in die Wildtypreferenz *F. graminearum* NRRL 13383 transformiert. Ein weiteres, sogenanntes Kontrollkonstrukt, wurde sowohl in das Wildtypisolats als auch in das P1-11 Isolat transformiert, was zu den s. g. *azr1*^{controlN} bzw. *azr1*^{controlP} Stämmen führte. Für die Erzeugung des Kontrollkonstruktes wurde der ORF des AZR1 Gens des Wildtypstammes am 3'Ende mit dem *Tnos* Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens* fusioniert. An dessen 3'Ende wurde eine Expressionskassette bestehend aus dem *gpdA* Promotors aus *A. nidulans* und dem *hph* Resistenzgen (Hygromycin-Phosphotransferase) aus *S. hygroscopicus* angehängt. Die jeweils 1000 bp des 5'-UTR und des 3'-UTR des AZR1 Gens flankierten das Konstrukt links und rechts (Ergänzende Abbildung 1A (Abb. E1A)). Mit Hilfe des Kontrollkonstruktes war es möglich zu überprüfen, ob nur die Einführung des *hph*

Resistenzgens hinter dem *AZR1* ORF unter Umständen bereits einen Einfluss auf die Phänotypen von Transformanten haben könnte.

Alle beschriebenen Konstrukte wurden nach erfolgreicher Klonierung in *E. coli* in das jeweils dafür vorgesehene *F. graminearum* Isolat transformiert. Für die von den Transformationsplatten gepickten Transformanten wurden Einzelsporisolate erzeugt, aus denen DNA isoliert wurde. Diese wurde für Test-PCRs und Southern-Blot-Hybridisierungen verwendet. Die für die Test-PCR verwendeten Primer überspannten den Ziellocus und die verwendeten Flanken. Aufgrund von Größenunterschieden der PCR-Produkte konnten Transformanten mit korrekter Integration des jeweiligen Konstruktes am Ziellocus ermittelt werden. Durch Southern-Blot-Hybridisierungen wurden danach unter diesen Transformanten solche ausgewählt, welche ausschließlich über eine einzelne, homologe Integration des Konstruktes am Ziellocus verfügten. Im Fall der Allelaustauschmutanten (*azr1*^{S368Y} Mutanten) wies eine einzelne Bande mit einer Größe von 6569 bp bzw. im Fall der Deletionsmutanten (Δ *azr1*) von 3319 bp auf das korrekte Integrationsereignis hin (Abb. 7B). Für die Kontrollmutanten wurde für das gesuchte Integrationsereignis ebenfalls eine einzige Bande von 6569 bp erwartet (E1B). Transformanten mit mehreren Banden wiesen mehrere Integrationsereignisse des Konstruktes auf und wurden für die weiteren Arbeiten nicht berücksichtigt. Für jedes der Konstrukte wurden zwei durch Southern-Blot-Hybridisierung bestätigte Transformanten für die folgenden Experimente ausgewählt.

Um ferner auszuschließen, dass durch die PCR-basierte Erzeugung der transformierten Konstrukte weitere, unerwünschte Mutationen in die Transformanten eingeführt wurden, die ggf. zu phänotypischen Veränderungen führen könnten, wurden auch Sanger-Sequenzierungen durchgeführt. Bei den *azr1*^{S368Y} Mutanten wurden der ORF von *AZR1* vollständig sowie die daran angrenzenden Bereiche teilweise sequenziert (Abb. 7C). Zusätzlich wurde die für die Integration verwendete 3'Flanke von *AZR1* sequenziert. Auf die gleiche Weise wurde mit den Kontrollmutanten verfahren (Abb. E1C). Sowohl bei dem zur Kontrolle mitgeführten Isolat P1-11 und den beiden nach der Southern Hybridisierung ausgewählten *azr1*^{S368Y} Mutanten wurde so die Base Adenin in der mittleren Position des für den Einzelnukleotid-Polymorphismus codierenden Codons bestätigt. Alle anderen sequenzierten Isolate zeigten das für den Wildtyp charakteristische Cytosin. Weitere Abweichungen von den jeweiligen Referenzsequenzen traten in keinem der untersuchten Stämme in keinem der sequenzierten Bereiche auf. Somit konnten in den *azr1*^{S368Y} Mutanten etwaig auftretende phänotypische Veränderungen ausschließlich auf die Substitution zurückzuführen sein, die in Azr1 in Position 368 zum AS-Austausch von Serin zu Tyrosin führte.

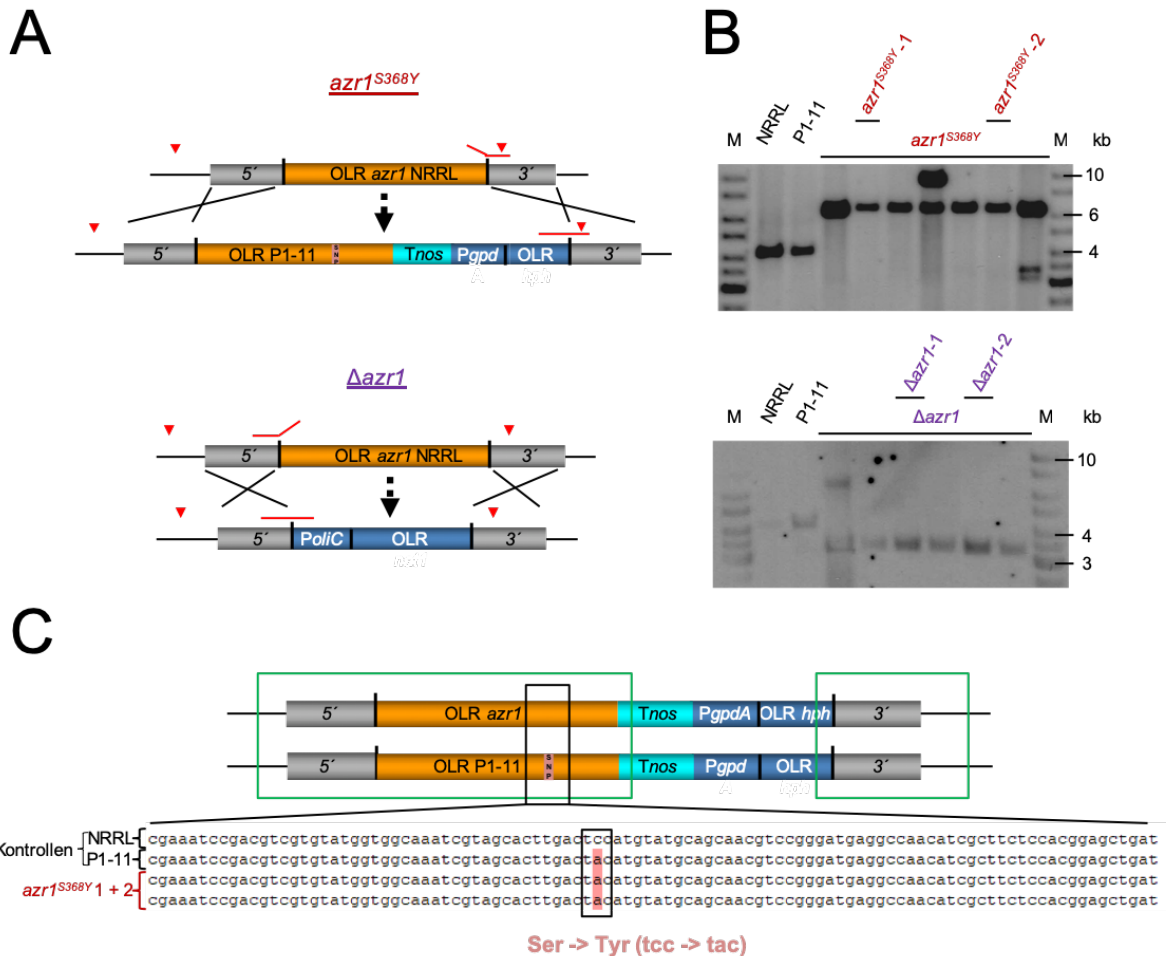


Abbildung 7: Erzeugung und Überprüfung der erzeugten Mutanten

- (A) Schematische Darstellung der für die Transformationen verwendeten Konstrukte und ihrer Integration durch Doppelcrossover am *AZR1* Wildtyp-Locus. *azr1^{S368Y}*: Einführung der Punktmutation im Codon 368; *Δazr1*: Deletion des gesamten ORFs. Rote Linien zeigen die in den Southern-Blots verwendeten Sonden, rote Pfeile die Schnittstellen der Restriktionsendonuklease *OliI*. Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu. OLR = Offener Leserahmen = ORF.
- (B) Southern-Blots der mit *OliI* verdauten genomischen DNAs des Wildtyps, von P1-11 und jeweils mehrerer Mutanten der Genotypen *azr1^{S368Y}* und *Δazr1*. Mutanten mit der richtigen Integration weisen bei *azr1^{S368Y}* eine Bande von 6569 bp auf bzw. 3319 bp bei *Δazr1*. Die Mutanten *azr1^{S368Y}* -1 und -2 sowie *Δazr1* -1 und -2 wurden für die weiteren Experimente ausgewählt.
- (C) Überprüfung der *azr1^{S368Y}* Transformanten mittels Sanger-Sequenzierung. Die grün markierten Boxen kennzeichnen die sequenzierten Bereiche. Die rot markierten Nukleotide zeigen die Position des SNPs an.

4.2 Charakterisierung der erzeugten Mutanten und Transformanten

4.2.1 Testung auf verschiedene Merkmale der Vitalität

Eine erhöhte Toleranz gegenüber Fungiziden kann mit Vitalitätsverlusten einher gehen, wie z.B. Probleme bei der Sporulation und der Keimung von Mikro- und Makrokonidien und dem

Myzelwachstum. Zusätzlich zeigen Fungizidtolerante Isolate nicht selten eine reduzierte Virulenz (Zhao et al. 2022b). Aus diesem Grund war es wichtig, die in dieser Arbeit erzeugten Mutanten und Transformanten auf verschiedene Merkmale der Vitalität hin zu analysieren.

Zu diesem Zweck wurden u.a. Wachstumsexperimente auf unterschiedlichen Nährmedien durchgeführt. Hierbei wurde der Einfluss des verwendeten Substrates und der Temperatur auf das vegetative Wachstum untersucht. Im Vergleich zu den nicht-transformierten Ausgangsstämmen NRRL 13383 und P1-11 zeigte keine Transformante signifikante Abweichungen in den Wachstumsraten auf PDA, MM, SNA und KA (Abb. 8A und B, E2 bis E6). Ebenso beeinflusste die Inkubationstemperatur das Wachstum aller Isolate in vergleichbarem Maße (Abb. E2 und E3). Zudem unterschieden sich in keiner der Mutanten die vegetativen Hyphen hinsichtlich ihres Durchmessers, ihrer Segmentlänge und ihrer Verzweigung von denen der Referenzisolate NRRL 13383 und P1-11 (Abb. E7).

Neben dem vegetativen Wachstum wurde auch die Sporulation der sexuell und asexuell gebildeten Sporen überprüft. Alle getesteten Transformanten produzierten Makrokonidien in MBB-Medium und Ascosporen auf Karotten-Agar in ähnlichen Mengen wie NRRL 13383 bzw. P1-11 (Abb. E8). Außerdem konnte bei keiner der Transformanten hinsichtlich dieser beiden Sporentypen eine Veränderung der Länge, der Krümmung oder der Septierung festgestellt werden (Abb. E8). Zudem unterschieden sich weder die Keimraten der gebildeten Makrokonidien noch der Ascosporen der Transformanten von denen der Referenzisolate (Abb. 8C, 8D, E9, E10). Zusammengefasst zeigen diese Versuche, dass weder die Deletion von *AZR1* noch der Aminosäureaustausch S368Y zu erkennbaren Einbußen der Vitalität gegenüber dem WT führte.

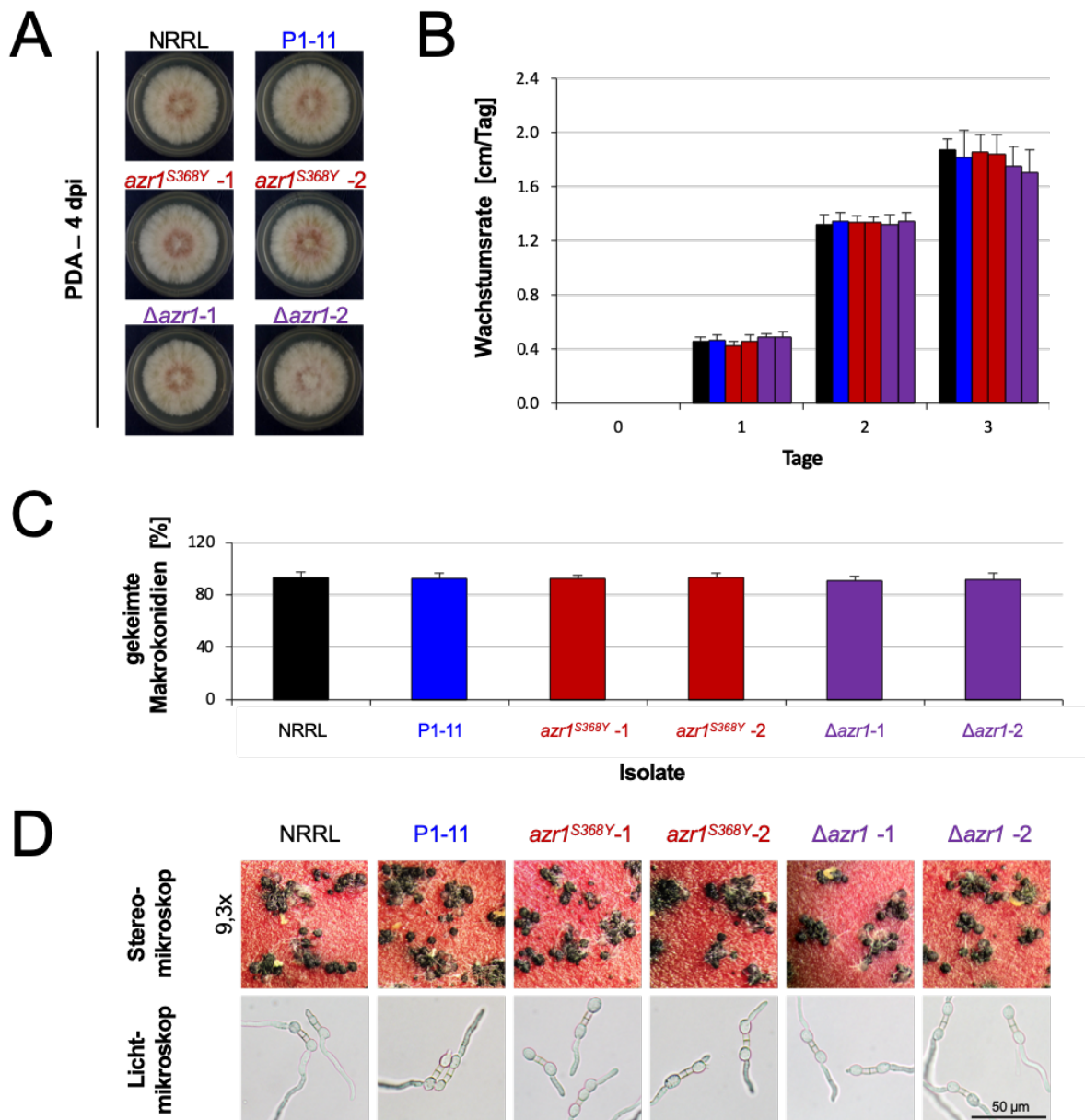


Abbildung 8: Weder die Deletion von *AZR1* noch der Aminosäureaustausch S368Y beeinflusst die Vitalität der Mutanten

- (A) Repräsentative Kulturen des Wildtypstammes, P1-11, *azr1^{S368Y}* und $\Delta azr1$ auf PDA bei 25 °C, 4 dpi.
- (B) Wachstumsraten des Wildtypstammes (schwarz), P1-11 (blau), *azr1^{S368Y}* (rot) und $\Delta azr1$ (violett) auf PDA bei 25 °C. Die Säulen repräsentieren den durchschnittlichen täglichen radialen Zuwachs des Myzels von 0 bis 4 dpi. Die Fehlerbalken sind SDs. Student's t-Test, $p < 0.05$.
- (C) Relative Zahl gekeimter Makrokonidien in PD von Wildtyp (schwarz), P1-11 (blau), *azr1^{S368Y}* (rot) und $\Delta azr1$ (violett). Die Fehlerbalken sind SDs. Student's t-Test, $p < 0.05$.
- (D) Die obere Reihe zeigt die Perithezienbildung des Wildtypstammes, P1-11, *azr1^{S368Y}* und $\Delta azr1$ auf Karotten-Agar, aufgenommen mit einem Stereomikroskop mit 9,3-facher Vergrößerung. Die untere Reihe zeigt die Ascosporen und deren Keimung. Maßstab 50 μm .

4.2.2 Die *azr1*^{S368Y}- und die Δ *azr1* Mutanten zeigen gegenüber dem Wildtypisolat keine Virulenzdefizite

Für ein Pflanzenpathogen ist seine Virulenz von zentraler Bedeutung, weswegen die in dieser Arbeit für das Gen *AZR1* erzeugten Mutanten, mit drei unterschiedliche Virulenztests untersucht wurden.

Im ersten Virulenztest wurden Weizenblütchen zum Zeitpunkt der Blüte inokuliert. Dieser Test kommt der natürlichen Weizeninfektion mit *F. graminearum* sehr nahe und zeigte, dass alle getesteten Transformanten eine den Referenzisolaten NRRL 13383 und P1-11 vergleichbare Virulenz besaßen (Abb. 9A, E11).

In einem weiteren Virulenztest wurden verwundete Maisstängel mit den zu testenden Isolaten sowie den Referenzisolaten NRRL 13383 und P1-11 inokuliert. Dieser Maisstängeltest stellte eine quantitative Methode dar, um unabhängig von einer Druck-vermittelten Penetration bzw. der enzymatischen Lyse der Cuticula und Zellwand die Fähigkeit der Isolate zu testen, das Wirtsgewebe zu besiedeln. Alle drei biologischen Wiederholungen zeigten deutlich, dass die den Einzelnukleotid-Polymorphismus enthaltenden *azr1*^{S368Y} Mutanten keine Virulenzdefekte aufwiesen (Abb. 9B). Ebenso verhielt es sich mit den Mutanten *azr1*^{controlN} und *azr1*^{controlP}. Die unabhängigen Transformanten dieser beiden als Kontrolle dienenden Isolate waren gleich virulent wie die Referenzisolate NRRL und P1-11 (Abb. E12). Hingegen zeigten die beiden getesteten Δ *azr1* Mutanten eine leicht erhöhte Virulenz, was aber nur in einem Fall (Δ *azr1*-1) signifikant war (Abb. 9B).

In einem weiteren Experiment sollte geklärt werden, ob die *azr1*^{S368Y} Mutanten, in denen der bei P1-11 entdeckte SNP in *AZR1* nachgestellt war, Azol-behandelte Weizenähren möglicherweise besser besiedeln können als der Wildtypstamm. Hierzu wurden Weizenähren zum Zeitpunkt der Blüte (ca. BBCH 65), zwei Tage vor Inokulation, mit dem Fungizid Ballet behandelt. Dieses enthält als einzigen Wirkstoff Tebuconazol. Der Vergleich mit dem analogen Versuch, bei dem kein Fungizid eingesetzt wurde (Abb. 9A), zeigte die starke Inhibierung aller Isolate durch Tebuconazol, so dass bei Versuchsende (11 dpi) maximal nur noch ca. 10 % der Blütchen symptomatisch waren anstatt etwa 55 % wie im Experiment ohne Fungizidbehandlung. Interessanterweise infizierte nicht nur P1-11 mehr Blütchen pro Ähre als der Wildtyp (Becher et al. 2010), sondern auch die *azr1*^{S368Y} Mutanten, wobei dies bei 11 dpi am deutlichsten war (Abb. 9C). Der Vergleich der beiden *azr1*^{S368Y} Mutanten mit dem P1-11 Isolat deutete an, dass der hier untersuchte SNP im *AZR1* Gen *in planta* zu einer erhöhten Azol-Toleranz führte. Der entdeckte SNP könnte somit alleinig für die erhöhte Azol Toleranz des P1-11 Isolates verantwortlich sein. Diesem Befund wurde im Rahmen von *in vitro* Fungizidversuchen weiter nachgegangen.

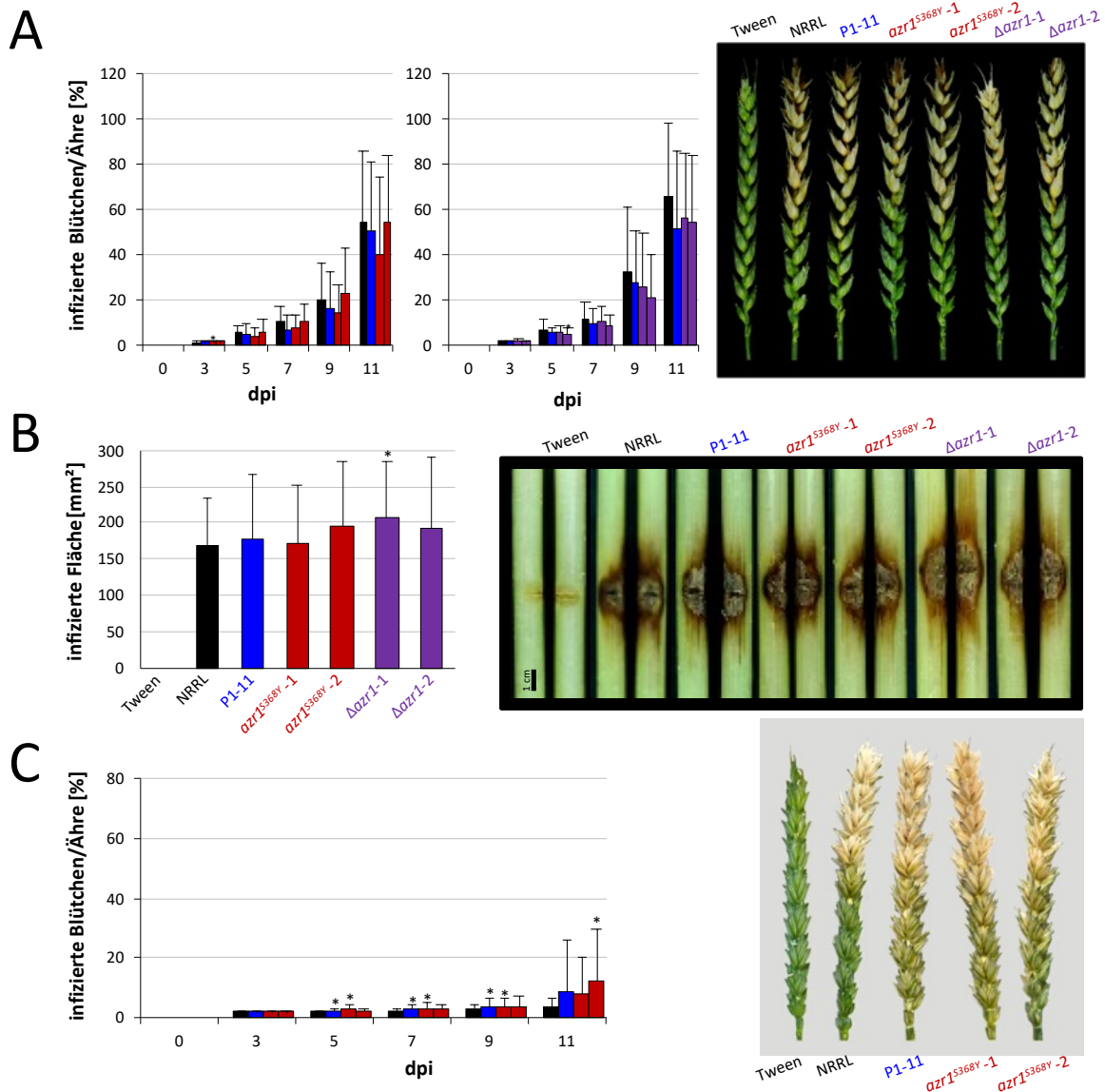


Abbildung 9: Die *azr1S368Y* Mutanten zeigen volle Virulenz auf Weizen und Mais und gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Virulenz auf Azol-behandelten Weizenähren.

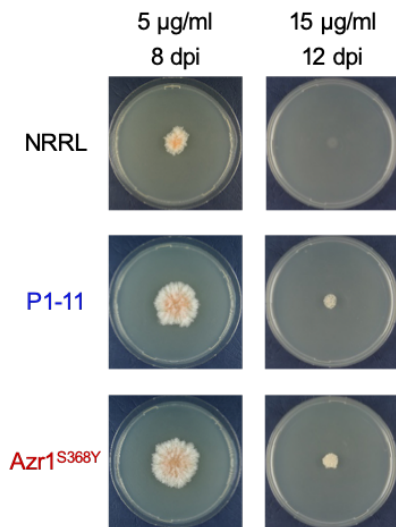
- (A) Die Säulen repräsentieren die durchschnittliche Anzahl infizierter Blütchen pro Ähre von Wildtyp (schwarz), P1-11 (blau), *azr1S368Y* (rot) und Δ *azr1* (violett). Die Fehlerbalken sind SDs. Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zum Wildtyp, Student's t-Test, $p < 0.05$. Die Fotos zeigen repräsentative Weizenähren an 11 dpi.
- (B) Durchschnittlich infizierte Fläche an gespaltenen Segmenten von Maisstängeln, hervorgerufen durch den Wildtyp (schwarz), P1-11 (blau), *azr1S368Y* (rot) und die Δ *azr1* (violett). Die Fehlerbalken sind SDs. Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zum Wildtyp an. Student's t-Test, $p < 0.05$. Die Fotos zeigen Maisstängel mit repräsentativer Symptomatik zum Zeitpunkt 10 dpi.
- (C) Die durchschnittliche Anzahl infizierter Blütchen pro Ähre von Wildtyp (schwarz), P1-11 (blau), *azr1S368Y* (rot) und Δ *azr1* (violett). Zwei Tage vor Inokulation erfolgte eine Behandlung des Weizens mit dem Fungizid Ballet. Die Fehlerbalken sind SDs. Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zum Wildtyp an. Student's t-Test, $p < 0.05$. Die Fotos zeigen Ähren mit typischer Symptomatik zum Zeitpunkt 13 dpi.

4.2.3 Fungizidtests

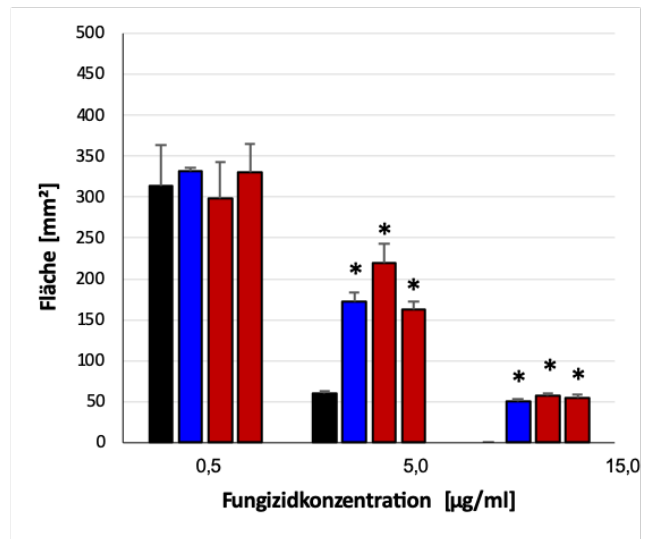
Das an Tebuconazol-adaptierte Isolat P1-11 verfügt im Vergleich zum Wildtypisolat NRRL 13383 über eine deutlich höhere Toleranz gegenüber Azol-Fungiziden (Becher et al. 2010). Das Genom dieses Isolates unterscheidet sich von dem des Wildtyps durch das Vorhandensein mehrerer SNPs, von denen einer innerhalb des Transkriptionsfaktorgens *AZR1* liegt (siehe 4.1.1). Um die Hypothese zu überprüfen, dass die Einführung dieses einen SNPs in *AZR1* zu dem Azol-toleranten P1-11-Phänotyp führte, wurde die Fungizidtoleranz der in dieser Arbeit erzeugten Transformanten mit zwei unterschiedlichen methodischen Ansätzen *in vitro* untersucht.

Im ersten Ansatz wurde die Fläche des Myzels auf Petrischalen, welche PDA mit verschiedenen Konzentrationen von Tebuconazol oder Epoxiconazol enthielten, gemessen. Sowohl bei Einsatz von Tebuconazol als auch von Epoxiconazol zeigte sich, dass die *azr1*^{S368Y} Mutanten und das P1-11 Isolat signifikant höhere Konzentrationen dieser beiden Azol-Fungizide im Vergleich zum Wildtypisolat NRRL 13383, den Kontrolltransformanten *azr1*^{controlN} und *azr1*^{controlP}, sowie den Δ *azr1* Mutanten ertrugen (Abb. 10, E13 und E14). Die *azr1*^{S368Y} Mutanten und das P1-11 Isolat zeigten auf Tebuconazol-haltigen Platten vegetatives Wachstum bis einschließlich einer Konzentration von 15 µg/ml, während NRRL 13383 nur bis zu einer Tebuconazol-Konzentration von 5 µg/ml wuchs. Im Fall von Epoxiconazol dagegen wuchsen die *azr1*^{S368Y} Mutanten selbst in Gegenwart von 40 µg/ml (Abb. 10), während NRRL 13383 lediglich bis zu einer Fungizidkonzentration von 7,5 µg/ml wachsen konnte. Interessanterweise wurde das vegetative Wachstum aller getesteten Isolate bis zu einer Konzentration von 2,5 µg/ml in gleichem Maße eingeschränkt (Abb. E13 und E14). Ab einer Konzentration von 2,5 µg/ml wuchsen die *azr1*^{S368Y} Mutanten jedoch signifikant besser als NRRL 13383 (Abb. E13 und E14). Auffällig war auch der bei allen getesteten Stämmen starke Abfall der Fungizidtoleranz von 0,1 gegenüber 0,5 µg/ml. Zusammenfassend bestätigte dieses Experiment, dass alleinig der SNP in *AZR1* für den Azol-toleranten Phänotyp des P1-11 Isolates verantwortlich ist.

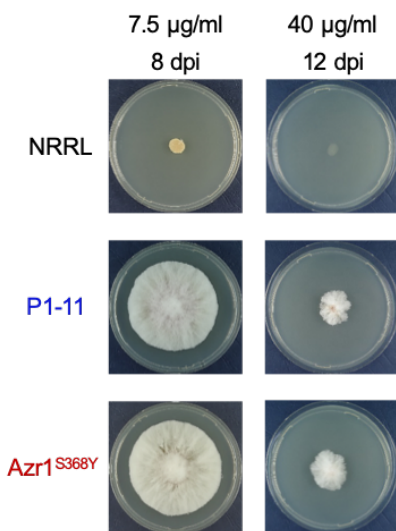
A



Tebuconazol



B



Epoxiconazol

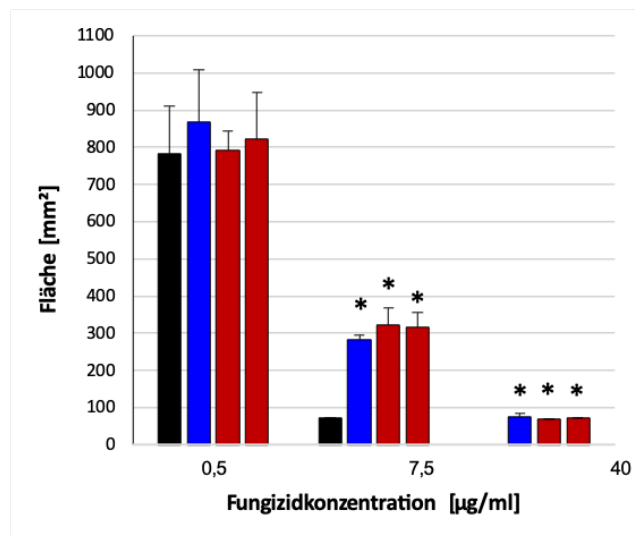


Abbildung 10: Die *azr1^{S368Y}* Mutanten sind toleranter gegenüber Tebuconazol und Epoxiconazol.

- (A) Die Fotos zeigen repräsentative Kulturen an 8 bzw. 12 dpi auf 5 bzw. 15 µg/ml Tebuconazol. 5 µg/ml war die höchste Konzentration, bei der das Wildtypisolat noch wuchs. 15 µg/ml war die höchste Konzentration, bei der die *azr1^{S368Y}* Mutanten noch wuchsen. Die Säulen repräsentieren drei ausgewählte Konzentrationen der gesamten Konzentrationsreihe (vgl. Abb. E13). Das Wachstum bei 0,5 µg/ml wird gezeigt, weil bei dieser Konzentration noch alle Stämme gleich inhibiert wurden. NRRL 13383 (schwarz), P1-11 (blau), *azr1^{S368Y}* (rot). Die Fehlerbalken stellen SDs dar. Student's t-Test, $p < 0.05$. Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zum Wildtyp an.
- (B) Die Fotos zeigen repräsentative Kulturen an 8 bzw. 12 dpi auf 7,5 bzw. 40 µg/ml Epoxiconazol. 7,5 µg/ml war die höchste Konzentration, bei der das Wildtypisolat noch wuchs. 40 µg/ml war die höchste Konzentration, bei der die *azr1^{S368Y}* Mutanten noch wuchsen. Die Säulen repräsentieren drei ausgewählte Konzentrationen der gesamten Konzentrationsreihe (vgl. Abb. E14). Das Wachstum bei 0,5 µg/ml wird gezeigt, weil bei dieser Konzentration noch alle Stämme gleich inhibiert wurden. NRRL 13383 (schwarz), P1-11 (blau), *azr1^{S368Y}* (rot). Die Fehlerbalken stellen SDs dar. Student's t-Test, $p < 0.05$. Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zum Wildtyp an.

Da die Azol-toleranten Isolate und das Wildtypisolat NRRL 13383 bis zu einer Konzentration von 2,5 µg/ml gleich stark inhibiert wurden, ist es nachvollziehbar, dass sich die ED₅₀ Werte nicht voneinander unterscheiden. Betrachtet man hingegen die ED₉₀ Werte, so zeigt sich, dass die effektiv benötigte Dosis für eine 90 %ige Wachstumshemmung der Azol-toleranten Isolate P1-11 und *azr1*^{S368} höher ist als die aller anderen getesteten Isolate (Tab. 1). Dieser Effekt tritt bei Anwendung von Epoxiconazol besonders deutlich hervor.

Tabelle 1: Die ED₉₀-Werte der *azr1*^{S368Y} Mutanten liegen deutlich über denen des Wildtyps.

ED₅₀- und ED₉₀-Werte von Wildtyp, P1-11, *azr1*^{S368Y}, *azr1*^{controlN}, *azr1*^{controlP} und Δ *azr1* Mutanten für Tebuconazol und Epoxiconazol. Für jeden Wert ist die Standardabweichung angegeben.

Fungizid	Isolat	ED ₅₀ [µg/ml]	ED ₉₀ [µg/ml]
Tebuconazol	NRRL	0,07 ± 0,02	0,96 ± 0,18
	P1-11	0,05 ± 0,01	1,47 ± 0,16
	<i>Azr1</i> ^{S368Y} -1	0,05 ± 0,02	1,87 ± 0,24
	<i>Azr1</i> ^{S368Y} -2	0,09 ± 0,06	1,87 ± 0,75
	<i>Azr1</i> ^{controlN} -1	0,10 ± 0,08	1,01 ± 0,19
	<i>Azr1</i> ^{controlN} -2	0,07 ± 0,00	0,83 ± 0,02
	<i>Azr1</i> ^{controlP} -1	0,08 ± 0,04	0,86 ± 0,22
	<i>Azr1</i> ^{controlP} -2	0,08 ± 0,01	0,87 ± 0,06
	Δ <i>azr1</i> -1	0,08 ± 0,01	0,84 ± 0,08
	Δ <i>azr1</i> -2	0,07 ± 0,01	0,85 ± 0,14
Epoxiconazol	NRRL	0,16 ± 0,01	1,75 ± 0,05
	P1-11	0,43 ± 0,29	6,26 ± 1,96
	<i>Azr1</i> ^{S368Y} -1	0,29 ± 0,04	9,48 ± 2,39
	<i>Azr1</i> ^{S368Y} -2	0,33 ± 0,10	7,63 ± 0,72
	<i>Azr1</i> ^{controlN} -1	0,24 ± 0,11	1,97 ± 0,11
	<i>Azr1</i> ^{controlN} -2	0,17 ± 0,01	1,80 ± 0,18
	<i>Azr1</i> ^{controlP} -1	0,20 ± 0,04	2,02 ± 0,10
	<i>Azr1</i> ^{controlP} -2	0,17 ± 0,04	1,85 ± 0,20
	Δ <i>azr1</i> -1	0,17 ± 0,08	2,31 ± 0,57
	Δ <i>azr1</i> -2	0,13 ± 0,01	1,34 ± 0,08

Bei dem zweiten Ansatz zur Bestimmung der Fungizidtoleranz *in vitro*, wurde das vegetative Wachstum in Gegenwart von Fungiziden im Mikrotiterplattenformat analysiert (Abb. 11). Diese Platten enthielten Resazurin als Farbindikator und erlaubten im Hochdurchsatz parallel die Testung vieler unterschiedlicher Fungizide mit jeweils mehreren Konzentrationen. Neben Tebuconazol und Epoxiconazol wurden nicht nur weitere Azole wie Prothioconazol, Metconazol, Cyproconazol, Prochloraz, sondern auch Thiophanate-methyl, Spiroxamin, Bixafen, Fluoxastrobin und Iprodion untersucht, die andere molekulare Wirkorte haben und somit anderen FRAC-Klassen angehören. Insgesamt wurden mit dem Resazurin-Test 11 Fungizide aus 6 FRAC-Klassen getestet. Zunächst wurde dieser Test mit Tebuconazol und Epoxiconazol durchgeführt, was die mit Hilfe der Plattentests erhaltenen Ergebnisse bestätigte. Dabei war der Farbton blau bis violett wenn keine Keimung und kein Wachstum stattfanden und pink bis weiß wenn Keimung bis starkes Hyphenwachstum und somit metabolische Aktivität vorhanden waren. Mit Tebuconazol zeigten die *azr1*^{S368Y} Mutanten und das P1-11 Isolat vegetatives Wachstum bis zu einer Konzentration zwischen 10 und 20 µg/ml, während das WT Isolat NRRL 13383 nur bis zu einer Konzentration von 5 µg/ml wuchs. Im Fall von Epoxiconazol dagegen wuchsen die *azr1*^{S368Y} Mutanten erneut bis zu einer Konzentration von 40 µg/ml, während NRRL 13383 lediglich bis zu einer Fungizidkonzentration von 5 µg/ml wachsen konnte. Neben Tebu- und Epoxiconazol wurden vier weitere Wirkstoffe aus der Gruppe der DMI-Fungizide getestet. Dabei gehören Cyproconazol und Metconazol ebenfalls zu den Triazolen, wohingegen Prothioconazol zu der Wirkstoffgruppe der Triazolinthione gehört. Prochloraz zählt zu den Imidazolen. Bemerkenswerterweise inhibierte Cyproconazol weder die Keimung noch das vegetative Wachstum irgendeines der getesteten Isolate. Noch höhere Konzentrationen konnten wegen des Erreichens der Löslichkeitsgrenze nicht getestet werden. Alle anderen Azol-Wirkstoffe inhibierten ab einer bestimmten Konzentration alle verwendeten Isolate, wobei dieser Effekt bei den *azr1*^{S368Y} Mutanten und dem P1-11 Isolat erneut geringer ausfiel. Im Gegensatz zu dem starken Effekt bei Tebuconazol und Epoxiconazol, waren die *azr1*^{S368Y} Mutanten und P1-11 bei Metconazol allerdings nur in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 1,5 µg/ml etwas toleranter als NRRL 13383. Auch bei Prochloraz inhibierten bereits geringe Konzentrationen das Wachstum aller Stämme. Die *azr1*^{S368Y} Mutanten und P1-11 waren nur bei 1 µg/ml toleranter als das Wildtypisolat. Eine Konzentration von 1 µg/ml Prothioconazol inhibierte NRRL 13383, wohingegen die *azr1*^{S368Y} Mutanten und P1-11 bis zu einer Konzentration von 1.5 µg/ml wuchsen. Demzufolge sind sowohl die *azr1*^{S368Y} Mutanten als auch P1-11 kreuzresistent, da sie tolerant gegenüber mehreren Fungiziden mit gleichem Wirkungsmechanismus und ähnlicher chemischer Struktur sind.

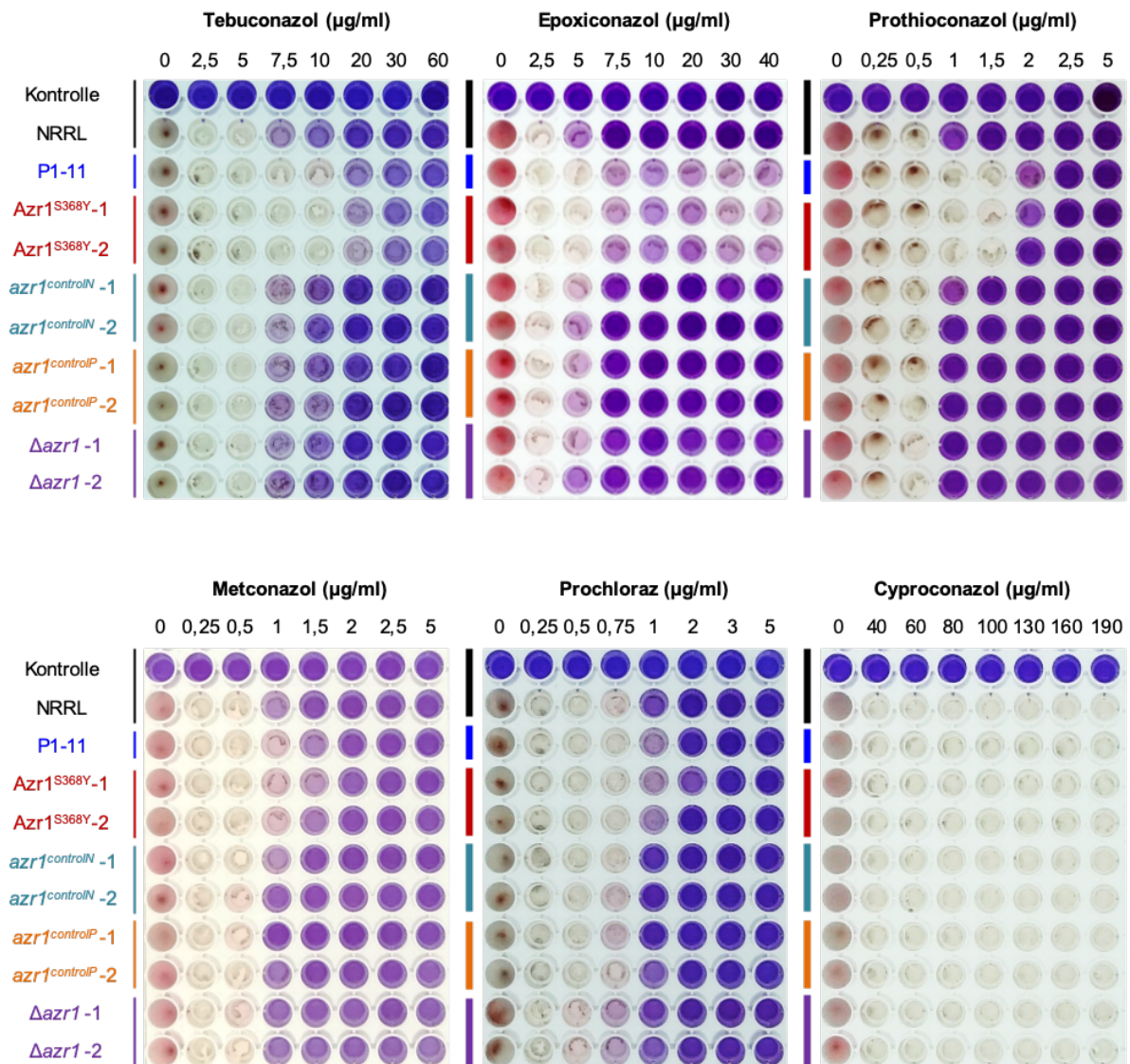


Abbildung 11: Die *azr1*^{S368Y} Mutanten zeigen Kreuzresistenz gegenüber verschiedenen Azolwirkstoffen.

Die Fotos zeigen das Ergebnis der Resazurintests von Wildtyp, P1-11, *azr1*^{S368Y}, *azr1*^{controlN}, *azr1*^{controlP} und $\Delta azr1$ Mutanten nach 4 dpi. Die ausgewählten Konzentrationsbereiche wurden für jedes der Azol-Fungizide in Vorversuchen ermittelt.

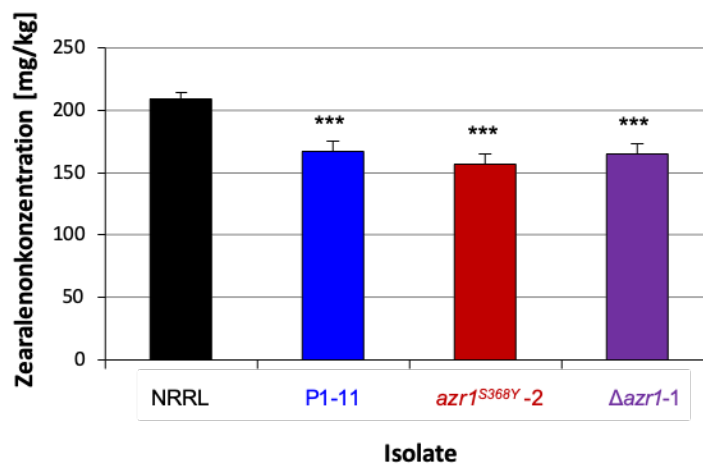
Um herauszufinden, ob sie auch parallelresistent sind, d.h. auch toleranter gegenüber fungiziden Wirkstoffen mit anderen Resistenzmechanismen sind, wurden auch Thiophanate-methyl, Spiroxamin, Bixafen, Fluoxastrobin und Iprodion getestet. Allerdings inhibierte keiner dieser fünf Wirkstoffe das Wachstum der hier getesteten Isolate und des Wildtyps NRRL 13383, obwohl Konzentrationen von bis zu 190 µg/ml verwendet wurden (Abb. E15).

4.2.4 Mykotoxinanalysen

Das verwendete Wildtypisolat NRRL 13383 ist in der Lage verschiedene Trichothecene zu bilden und gehört dem Nivalenol (NIV) Chemotyp an. Neben diesem Isolat wurden das Azol-tolerante Isolat P1-

11, sowie die *azr1*^{S368Y} und Δ *azr1* Mutanten hinsichtlich ihrer Fähigkeit analysiert, die beiden Mykotoxine Zearalenon (ZEA) und Nivalenol (NIV) zu produzieren (Abb. 12). P1-11, die *azr1*^{S368Y} und die Δ *azr1* Mutanten produzierten signifikant weniger Zearalenon als das Wildtypisolat (Abb. 12A). Demgegenüber traten bei keinem der getesteten Isolate im Vergleich zu NRRL 13383 signifikante Unterschiede bei den Nivalenolgehalten auf. Allerdings sieht es so aus, als ob der Wildtyp ggf. weniger Nivalenol als die *azr1*^{S368Y} und Δ *azr1* Mutanten produzieren würde, was wegen der höheren Streuung in dieser Messung nicht signifikant war. Diese Messungen zeigen klar, dass der Transkriptionsfaktor Azr1 die Zearalenon Produktion signifikant beeinflusst.

A



B

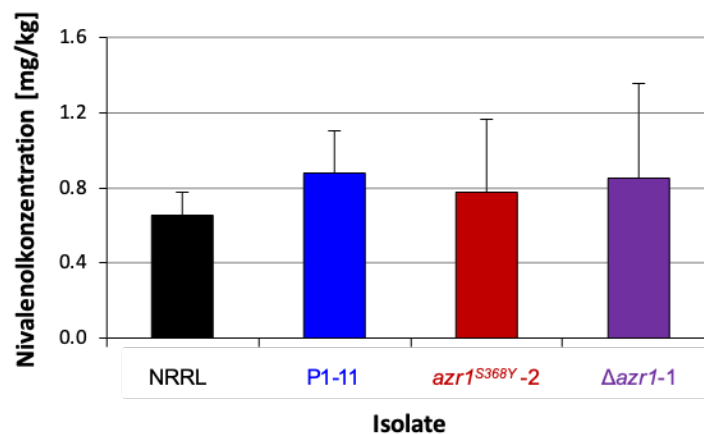


Abbildung 12: Die *azr1*^{S368Y} und die Δ *azr1* Mutanten produzieren *in vitro* signifikant weniger Zearalenon.

- (A) Die Säulen repräsentieren die durchschnittlich produzierten Mengen an Zearalenon in mg/kg von NRRL 13383, P1-11 und einer *azr1*^{S368Y} - und einer Δ *azr1* Mutante. Die Fehlerbalken stellen SDs dar. Student's t-Test, $p < 0.00001$. Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zum Wildtyp an.
- (B) Durchschnittlich Mengen an Nivalenol in mg/kg von NRRL 13383, P1-11 und einer *azr1*^{S368Y} - und einer Δ *azr1* Mutante. Die Fehlerbalken stellen SDs dar. Student's t-Test, $p < 0.05$.

4.3 Azr1 beeinflusst die Transkription zahlreicher Gene

4.3.1 Anzahl der signifikant differentiell exprimierten Gene (DEGs) unter Standardbedingungen und unter Fungizid-Stress

In dieser Arbeit durchgeführten RNAseq-Analysen bestanden aus zwei identisch aufgebauten Datensätzen, welche zeitlich versetzt voneinander erzeugt wurden und jeweils das Wildtypisolat NRRL 13383 als Referenzisolat enthielten. Der erste Datensatz umfasste die Transkriptgehalte der beiden unabhängigen *azr1*^{S368Y} Mutanten und die des Wildtypisolates unter Standardbedingungen oder unter Fungizid-Stress. Im Zweiten Datensatz wurden dann auf die gleiche Art und Weise die Transkriptgehalte der beiden unabhängigen Δ *azr1* Mutanten mit denen des Wildtypisolates verglichen. Dabei erhöhte die Verwendung von zwei unabhängigen Mutanten pro Genotyp die Qualität der RNAseq Datensätze deutlich, wenngleich auch die Variation zwischen unabhängigen Mutanten des gleichen Genotyps die Interpretation von RNAseq Datensätzen deutlich erschweren kann.

Beide Datensätze wurden jeweils durch zwei verschiedene Ansätze analysiert. Im ersten Ansatz wurden die Transkriptgehalte jeder unabhängigen Mutante, jeweils mit denen des Wildtyps verglichen, zum einen unter Standardbedingungen und zum anderen nach einer Zugabe von 5 ppm Tebuconazol (Abb. 13). Bei dem zweiten Ansatz wurde dagegen die Reaktion der Mutanten auf die Fungizidbehandlung mit der entsprechenden Reaktion des Wildtyps verglichen. Zu diesem Zweck wurden zunächst in jedem Stamm einzeln die signifikant differentiell exprimierten Gene (DEGs) zwischen Standardbedingungen und Fungizid-Stress bestimmt. Dabei repräsentierte ein DEG ein Gen mit einer Genidentifikationsnummer (ID), dessen Transkriptgehalte im jeweiligen Vergleich differentiell dereguliert waren und einen p_{adjusted} Wert von < 0.05 ergaben. Anschließend wurden die so erhaltenen DEGs in verschiedenen Kombinationen mit jeweils einem der beiden anderen Stämme bzw. mit beiden Stämmen gemeinsam verglichen und die entsprechende Schnittmenge gebildet (Abb. 14).

Beim ersten Ansatz gab es unter Standardbedingungen lediglich ein gemeinsames DEG in den beiden *azr1*^{S368Y} Mutanten und unter Fungizid-Stress zwei gemeinsame DEGs im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 13A, Tab. E1). Bei dem Vergleich der Genidentifikationsnummern (IDs) der unter Standardbedingungen (1 DEG) und unter Fungizid-Stress (2 DEGs) erhaltenen DEGs stellte es sich heraus, dass es kein DEG gab, dass sowohl unter Standardbedingungen als auch unter Fungizid-Stress in beiden unabhängigen *azr1*^{S368Y} Mutanten signifikant unterschiedlich zum Wildtyp reguliert war.

Im Fall der beiden unabhängigen Δ *azr1* Mutanten gab es dagegen im Vergleich zum Wildtyp unter Standardbedingungen 1654 gemeinsame DEGs und unter Fungizid-Stress 824 gemeinsame DEGs (Abb. 13B). Bei dem Vergleich der Genidentifikationsnummern (IDs) der unter Standardbedingungen (1654

DEGs) und unter Fungizid-Stress (824 DEGs) erhaltenen DEGs stellte es sich heraus, dass sich die Transkriptgehalte von 382 DEGs sowohl unter Standardbedingungen als auch unter Fungizid-Stress in beiden unabhängigen *Δazr1* Mutanten signifikant von denen des Wildtyps unterschieden. Dies bedeutete, dass 1272 Gene ausschließlich unter Standardbedingungen in beiden unabhängigen *Δazr1* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp signifikant dereguliert waren. Dagegen waren 442 Gene ausschließlich unter Fungizid-Stress in beiden unabhängigen *Δazr1* Mutanten signifikant unterschiedlich zum Wildtyp dereguliert (Tab. E2).

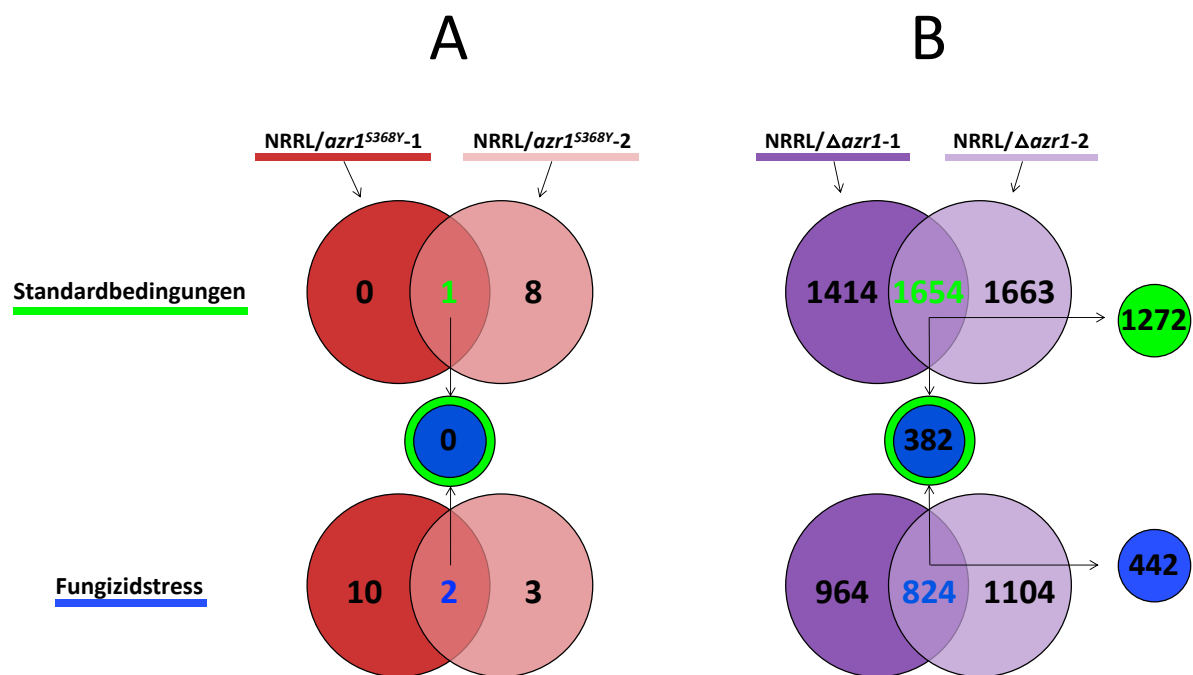


Abbildung 13: Das Transkriptom der *Δazr1* Mutanten unterscheidet sich deutlich stärker von dem des Wildtypisolates als das der *azr1^{S368Y}* Mutanten.

- (A) Anzahl der in beiden *azr1^{S368Y}* Mutanten gemeinsam auftretenden DEGs im Vergleich zu NRRL 13383 unter Standardbedingungen (grüne Schrift) und unter Fungizid-Stress (blaue Schrift). Unter Standardbedingungen gab es bei der *azr1^{S368Y}-1* Mutante ein Gen und bei der *azr1^{S368Y}-2* Mutante neun DEGs. Nach Behandlung mit Tebuconazol ergaben sich für die *azr1^{S368Y}-1* Mutante 12 DEGs und für die *azr1^{S368Y}-2* Mutante fünf Gene DEGs. Die Anzahl an gemeinsamen DEGs zwischen Standardbedingungen und Fungizid-Stress betrug null (blauer Kreis mit grünen Rand).
- (B) Anzahl der in beiden *Δazr1* Mutanten gemeinsam auftretenden DEGs im Vergleich zu NRRL 13383 unter Standardbedingungen (grüne Schrift) und Behandlung mit Tebuconazol (blau). Unter Standardbedingungen gab es bei der *Δazr1-1* Mutante 3068 DEGs und bei der *Δazr1-2* Mutante 3317 DEGs. Unter Fungizid-Stress ergaben sich für die *Δazr1-1* Mutante 1788 DEGs und für die *Δazr1-2* Mutante 1928 DEGs. Die Anzahl an gemeinsamen DEGs zwischen Standardbedingungen und Fungizid-Stress ist 382 (blauer Kreis mit grünen Rand). 1272 der 1654 DEGs traten ausschließlich unter Standardbedingungen auf und 442 der 824 Gene ausschließlich unter Fungizid-Stress.

Beim zweiten Ansatz der Datenanalyse, der die Reaktion auf die Fungizid-Behandlung der Mutanten mit der Reaktion von NRRL 13383 verglich, zeigte sich folgendes Bild (Abb. 14). Im Fall des *azr1*^{S368Y} Datensatzes wurden als Antwort auf Fungizid-Stress insgesamt 189 DEGs (55 + 46 + 81 + 7) für den Wildtyp gefunden (Abb. 14A). Dabei traten 55 dieser DEGs ausschließlich im Wildtyp auf, aber in keiner der beiden unabhängigen *azr1*^{S368Y} Mutanten, während 81 DEGs sowohl im Wildtyp als auch in beiden *azr1*^{S368Y} Mutanten vorkamen. In der *azr1*^{S368Y}-1 Mutante waren insgesamt 1047 Gene (726 + 194 + 81 + 46) als Antwort auf Fungizid-Stress signifikant differentiell reguliert und in der *azr1*^{S368Y}-2 Mutante insgesamt 421 Gene (139 + 7 + 81 + 194). 194 Gene waren dabei ausschließlich in den beiden *azr1*^{S368Y} Mutanten als Antwort auf Fungizid-Stress signifikant dereguliert, nicht aber im Wildtyp (Abb. 14A, Tab. E1).

Demgegenüber gab es in dem Δ *azr1*-Datensatz beim Wildtyp als Antwort auf Fungizid-Stress insgesamt 393 DEGs (332 + 12 + 24 + 25) (Abb. 14B). Dabei traten 332 dieser DEGs ausschließlich im Wildtyp auf, aber in keiner der beiden unabhängigen Δ *azr1* Mutanten. Dagegen gab es 24 DEGs, die in allen drei Stämmen auftraten. In der Δ *azr1*-1 Mutante waren insgesamt 203 Gene (111 + 56 + 24 + 12) als Antwort auf Fungizid-Stress signifikant differentiell reguliert, während dies bei der Δ *azr1*-2 Mutante insgesamt 338 Gene (233 + 25 + 24 + 56) waren. 56 Gene traten dabei ausschließlich in den beiden Δ *azr1* Mutanten auf, nicht aber im Wildtyp (Abb. 14B, Tab. E2).

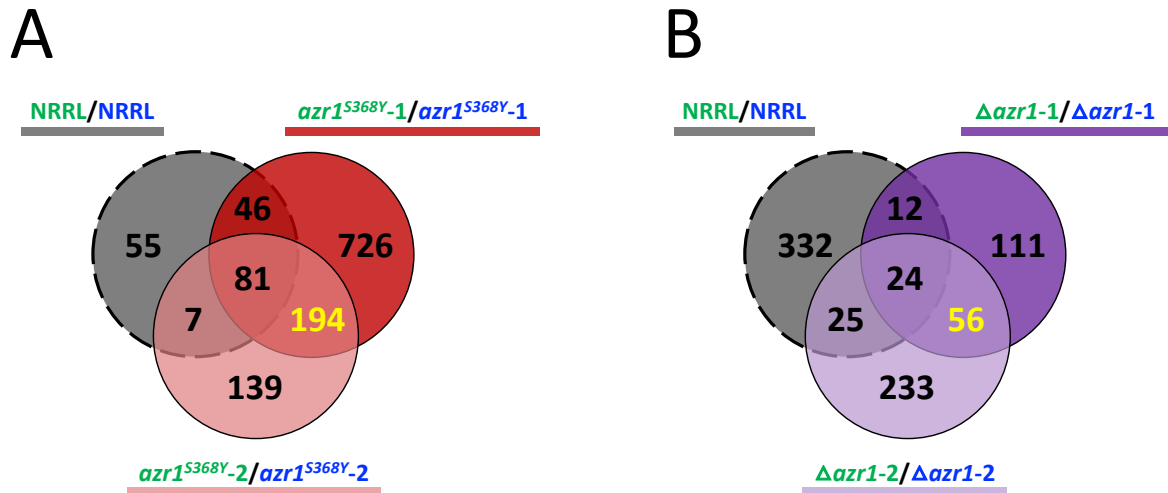


Abbildung 14: Sowohl die *azr1^{S368Y}* Mutanten als auch die Δ *azr1* Mutanten zeigen eine sich vom Wildtyp unterscheidende transkriptionelle Antwort auf Fungizid-Stress.

- (A) Dargestellt ist die Anzahl der DEGs beim Vergleich der Standardbedingung (grüne Schrift) mit der Behandlung mit Tebuconazol (blaue Schrift) jeweils für das Wildtypisolat (graue Unterstreichung) und den beiden unabhängigen *azr1^{S368Y}* Mutanten (rote Unterstreichung). Dabei waren 55 Gene ausschließlich im Wildtyp, 46 Gene im Wildtyp und der *azr1^{S368Y}-1* Mutante, 7 Gene im Wildtyp und der *azr1^{S368Y}-2* Mutante und 81 Gene in allen drei Stämmen signifikant dereguliert. 726 Gene waren ausschließlich in der *azr1^{S368Y}-1* Mutante und 139 Gene ausschließlich in der *azr1^{S368Y}-2* Mutante dereguliert. 194 DEGs traten in beiden Mutanten gemeinsam auf.
- (B) Dargestellt ist die Anzahl der DEGs beim Vergleich der Standardbedingung (grüne Schrift) mit der Behandlung mit Tebuconazol (blaue Schrift) jeweils für das Wildtypisolat (graue Unterstreichung) und den beiden unabhängigen Δ *azr1* Mutanten (violette Unterstreichung). Dabei waren 332 Gene ausschließlich im Wildtyp, 12 Gene im Wildtyp und der Δ *azr1-1* Mutante, 25 Gene im Wildtyp und der Δ *azr1-2* Mutante und 24 Gene in allen drei Stämmen signifikant dereguliert. 111 Gene waren ausschließlich in der Δ *azr1-1* Mutante und 233 Gene ausschließlich in der Δ *azr1-2* Mutante dereguliert. 56 DEGs traten in beiden Mutanten gemeinsam auf.

4.3.2 Betrachtung besonders interessanter differentiell exprimierter Gene (DEGs)

Interessanterweise handelte es sich laut der EnsemblFungi-Beschreibung (siehe 3.7.1) bei der Mehrheit der oben aufgezählten DEGs um hypothetische Proteine, deren Funktion oft unbekannt war. Viele der hier nachfolgend genannten Proteine sind besonders innerhalb der Gattung *Fusarium* konserviert und einige ausschließlich innerhalb *F. graminearum* (siehe 3.7.2 und 4.1.2). Zu den orthologen Proteinen aus den meisten anderen filamentösen Pilzen lag oftmals weniger als 50 % Identität vor. Zudem handelte es sich bei diesen oftmals um die gleichen Arten.

4.3.2.1 Interessante DEGs der *azr1*^{S368Y} Mutanten

Unter Standardbedingungen war im Vergleich zum Wildtyp nur ein gemeinsames Gen (FGRAMPH1_01G04947) in den beiden *azr1*^{S368Y} Mutanten signifikant dereguliert. Bei diesem handelte es sich um ein hypothetisches Protein, dessen Funktion unbekannt ist und für das keine Domänenvorhersagen existierten (Abb. 13A, Tab. E1). Das Gen war in beiden *azr1*^{S368Y} Mutanten im Vergleich zum Wildtyp signifikant herunterreguliert. Dieses Gen ist hoch konserviert innerhalb der *Fusarium* spp. und es besaß kein Ortholog in *Saccharomyces cerevisiae*. Orthologe gab es stattdessen u. a. in den Gattungen: *Acremonium*, *Beauveria*, *Colletotrichum*, *Drechmeria*, *Metarhizium*, *Neonectria*, *Stachybotrys*, *Trichoderma* und *Verticillium*, wobei diese alle zu der Klasse der Sordariomycetes gehören.

Unter Fungizid-Stress waren im Vergleich zum Wildtyp die Transkriptgehalte von zwei Genen in beiden *azr1*^{S368Y} Mutanten signifikant erhöht (Abb. 13A, Tab. E1). Bei einem (FGRAMPH1_01G15627) handelte es sich um den bereits mit Azol-Resistenz in Verbindung gebrachten ABC-Transporter *ABC3* (Abou Ammar et al. 2013). Das andere Gen (FGRAMPH1_01G25277) hatte jedoch keine bekannte Funktion. Es verfügte über eine FAD/NAD(P)-bindende Domäne, welche in den Klassen I und Klasse II der Oxidoreduktasen gefunden wird (siehe 3.7.1). Bei Oxidoreduktasen handelt es sich um Enzyme, welche NADP⁺ / NADPH+H⁺ oder NAD⁺ / NADH+H⁺ als Cofaktoren verwenden. Orthologe zu diesem Gen existieren laut EnsemblFungi nicht in Hefen, aber in anderen Pflanzenpathogenen.

Als Reaktion auf Fungizid-Stress waren 81 Gene sowohl im Wildtyp als auch in den beiden *azr1*^{S368Y} Mutanten signifikant dereguliert (Abb. 14A). Elf dieser Gene waren besonders interessant, da sie in beiden unabhängigen Mutanten einen log₂FC von ≥ 1 zeigten und somit signifikant stärker dereguliert waren als im Wildtyp (Tab. E1). Drei dieser elf Gene wiesen höhere Transkriptgehalte im Vergleich zum Wildtyp auf, darunter der ABC-Transporter *PDR5* (FGRAMPH1_01G09633) und das bereits weiter oben erwähnte Gen für eine unbekannte Oxidoreduktase (FGRAMPH1_01G25277). Bei dem dritten Gen handelte es sich um die Sterol-24-C-methyltransferase *ERG6* (siehe 4.3.2.4). Eines der im Vergleich zum Wildtyp signifikant weniger stark hochregulierten Gene (FGRAMPH1_01G26375) verfügte überraschenderweise über eine Phycocyanin Domäne, welche bisher noch nicht in Pilzen beschrieben wurde, aber eine Rolle in den Chloroplasten höherer Pflanzen spielt und mit der Blattseneszenz in Verbindung gebracht wurde (Hao et al. 2022). In diesem Zusammenhang könnte es von erheblichem Interesse sein, dass das von diesem Gen kodierte Protein über ein Signalpeptid verfügte. Dieses Gen hat insgesamt 17 orthologe Gene vor allem in den Gattungen *Fusarium*, *Verticillium* und *Colletotrichum*.

Beim Vergleich der nicht-induzierten zu den mit Tebuconazol behandelten Stämmen (Ansatz 2) waren 194 Gene in beiden *azr1*^{S368Y} Mutanten signifikant dereguliert, aber nicht in NRRL 13383 (Abb. 14A, Tab. E1). Unter diesen wiesen 51 Gene in beiden unabhängigen Mutanten einen log₂FC von ≥ 1 auf. Die Transkriptgehalte von 28 Genen waren signifikant hochreguliert und die von 23 Genen signifikant herunterreguliert. Insgesamt codierten 17 der 51 Gene (33%) für Gene von SMCs, von denen 7 hochreguliert waren (siehe 4.3.2.3). Des Weiteren verfügten die Proteine von 18 der 51 Gene (35%) über eine Transmembrandomäne (TMD), wobei 14 dieser 18 Gene hochreguliert und vier herunterreguliert waren. Sechs der 18 Gene codierten für Transporter: FGRAMPH1_01G16541 (Oligopeptidtransporter), FGRAMPH1_01G11433 (Protonen-abhängiger Oligopeptidtransporter), FGRAMPH1_01G05569 (MFS-Transporter, SMC C13), FGRAMPH1_01G05153 (ABC-Transporter, SMC C10), FGRAMPH1_01G18933 (Aminosäuretransporter), FGRAMPH1_01G13579 (ABC-Transporter, SMC C22). Bis auf das letzte der genannten Gene, welches herunterreguliert war, waren die anderen alle hochreguliert. Auch der 3' neben *ABC3* liegende Zinkfinger-Transkriptionsfaktor (FGRAMPH1_01G15629) war in beiden Punktmutanten bei Fungizid-Stress signifikant stärker hochreguliert als im Wildtyp. Beide Gene gehörten zu dem SMC C16. Dieser Transkriptionsfaktor war konserviert in *Fusarium*-, *Stachybotrys*-, *Trichoderma*- und *Aspergillus*-Spezies, jedoch nicht in *Saccharomyces cerevisiae*. Auch ein 5' von *AZR1* liegendes Nachbargen (FGRAMPH1_01G12519) war in beiden *azr1*^{S368Y} Mutanten stärker hochreguliert als im Wildtyp. Es verfügt über eine Oxidoreduktasedomäne und war hoch konserviert in *Fusarium*-Spezies und in Pilzen aus der Ordnung der *Diaporthales*, deren Kompetenz zur Synthese von Proteinen mit anti-bakterieller und -fungaler Aktivität bekannt ist (Tanney et al. 2016; Selitrennikoff 2001). Auch das *CYP51A* Gen (*ERG11*), welches das Target der Azol-Fungizide ist, war in den Mutanten signifikant hochreguliert (siehe 4.3.2.4), ebenso wie das Gen FGRAMPH1_01G20829. Letzteres verfügte über eine EXPERA-Domäne, die vier Transmembranregionen enthält, vermutlich eine Sterolisomerase katalytische Aktivität besitzt und somit eine Rolle in der Ergosterolbiosynthese spielen könnte (Sanchez-Pulido and Ponting 2014). Demgegenüber wurde das Gen FGRAMPH1_01G16217 in beiden Mutanten signifikant stärker herunterreguliert als im Wildtyp. Es codiert für ein potenzielles anti-fungales Protein mit Signalpeptid. Nach EnsemblFungi sind bisher für dieses nur 7 Orthologe in anderen Organismen dokumentiert worden (*Aspergillus fischeri*, *Aspergillus niger*, *Beauveria bassiana*, *Colletotrichum orbiculare*, *Fusarium culmorum* und *F. pseudograminearum*, *Penicillium antarcticum*). Ansonsten waren in den Punktmutanten vier Gene des Aurofusarin SMC C13, der für die Synthese von Aurofusarin verantwortlich ist, signifikant stärker herunterreguliert als im Wildtyp. Der bereits oben erwähnte MFS-Transporter FGRAMPH1_01G05569 aus SMC C13 war dagegen stärker hochreguliert als im Wildtyp (siehe 4.3.2.3).

4.3.2.2 Interessante DEGs der $\Delta azr1$ Mutanten

In beiden unabhängigen $\Delta azr1$ Mutanten waren 1272 Gene ausschließlich unter Standardbedingungen im Vergleich zum Wildtyp signifikant dereguliert (Abb. 13B, Tab. E2). Von diesen wiesen 91 Gene in beiden Mutanten einen \log_2FC von $\geq 1,5$ auf, von denen 13 Gene (14.2 %) in SMCs liegen. Proteine, die von 19 der 91 Gene (20.8 %) codiert werden, wiesen mindestens eine TMD auf. Unter anderem waren im Vergleich zum Wildtyp ein MFS-Transporter (FGRAMPH1_01G12569) und ein ABC-Transporter (FGRAMPH1_01G18277) signifikant herunterreguliert. In einigen wenigen Fällen unterschieden sich die Transkriptgehalte nur in einer der beiden unabhängigen Mutanten deutlich vom Wildtyp (Tab. E2). Mindestens 35 der 91 DEGs ($\geq 39\%$) codierten für Enzyme.

Die Transkriptgehalte von 382 Genen waren sowohl unter Standardbedingungen als auch unter Fungizid-Stress im Vergleich zwischen $\Delta azr1$ Mutanten und Wildtyp signifikant verschieden (Abb.13B, Tab. E2). Unter Anwendung eines Filters von \log_2FC von $\geq 1,5$ blieben 85 DEGs übrig. Bei 16 dieser Gene (19 %) handelte es sich um hypothetische Proteine, deren Funktion ebenso wie deren Domänen nicht bekannt waren. Vierzehn der 85 Gene (16 %) waren SMCs zugeordnet (siehe 4.3.2.3). Bei den drei am stärksten hochregulierten Genen handelte es sich um FGRAMPH1_01G12519, FGRAMPH1_01G16217 und FGRAMPH1_01G16215, wobei die beiden zuletzt genannten in enger räumlicher Nähe im Genom lagen. FGRAMPH1_01G12519 codierte für eine Oxidoreduktase, welche in *Fusarium*-Spezies und Pilzen der Ordnung Diaporthales hoch konserviert ist und aufgrund der direkten Nachbarschaft zu *AZR1* von besonderem Interesse sein könnte. FGRAMPH1_01G16217 (anti-fungales Protein) wurde bereits oben bei den *azr1*^{S368Y} Mutanten erwähnt, da es unter Fungizid-Stress in beiden unabhängigen Mutanten im Vergleich zum Wildtyp herunterreguliert war. Dies war nur eines vieler Beispiele, die belegten, dass der Einzelnukleotidaustausch im *AZR1* Gen nicht denselben Effekt auf die Transkriptgehalte im Genom von *F. graminearum* hervorrief wie die Deletion von *AZR1*. Über das benachbarte Gen FGRAMPH1_01G16215 ist lediglich bekannt, dass es über ein Signalpeptid verfügte. Insgesamt codierten 12 der 85 Gene (14 %), deren Transkriptgehalte sich in den $\Delta azr1$ Mutanten unabhängig von Tebuconazol von denen des WT um \log_2FC von $\geq 1,5$ unterschieden, für kleine Proteine (39 bis 192 AS), welche allerdings mehrheitlich keine Signalpeptide aufwiesen. Sieben dieser Gene waren sowohl unter Standardbedingungen als auch unter Fungizid-Stress hochreguliert und 5 herunterreguliert. Fast alle dieser Gene waren hoch konserviert innerhalb der *Fusarium*-Spezies. Sie verfügten ansonsten jedoch selten über orthologe Gene in anderen Organismen, die wenn zumeist aus den Gattungen *Colletotrichum*, *Penicillium*, *Neonectria*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Metarhizium*, *Stachybotrys* und *Verticillium* stammten. Interessanterweise kamen 4 der 12 Gene ausschließlich in *Fusarium graminearum* vor. Drei im Genom direkt benachbarte Gene (FGRAMPH1_01G13131, FGRAMPH1_01G13133, FGRAMPH1_01G13135) waren in den $\Delta azr1$ Mutanten unter

Standardbedingungen und Fungizid-Stress stärker herunterreguliert als im Wildtyp. Es handelte sich um bisher uncharakterisierte Gene, welche keine Orthologen in *Saccharomyces cerevisiae* aufwiesen. FGRAMPH1_01G13131 codierte für eine putative 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase, ein Enzym, welches wahrscheinlich am Fettsäuremetabolismus beteiligt ist. FGRAMPH1_01G13133 codierte für eine Reduktase mit TMD, welche als Membran gebundenes Hämoprotein als Elektronenüberträger für einige Membran gebundene Oxygenasen fungieren kann. FGRAMPH1_01G13135 codierte für ein Cytochrom P450, welches möglicherweise an der Oxidation von Steroiden und Fettsäuren beteiligt ist. Es liegt die Vermutung nahe, dass diese drei Proteine in die Membranbiosynthese eingebunden sind. Des Weiteren waren drei Gene aus drei verschiedenen SMCs unabhängig von der Tebuconazol Behandlung in den $\Delta azr1$ Mutanten im Vergleich zum Wildtyp herunterreguliert. FGRAMPH1_01G07279 codierte für einen MFS-Transporter (SMC 58), FGRAMPH1_01G05109 für eine Peptidase (SMC 9) und FGRAMPH1_01G27717 für eine Dehydrogenase (SMC 53). Auch ein ABC-Transporter (FGRAMPH1_01G10937) war unter beiden Bedingungen herunterreguliert. Dieser wies Sequenzähnlichkeiten zu *PDR11* und *AUS1* aus *S. cerevisiae* auf, also zu zwei sogenannten „multi drug resistance“-Transportern, welche der Sterol-Aufnahme dienen und durch *PDR1* reguliert werden. Auch das Zinkfinger-Transkriptionsfaktorgen *WAR1* war unter beiden Bedingungen in beiden $\Delta azr1$ Mutanten stärker herunterreguliert als im Wildtyp. In *S. cerevisiae* reguliert *War1* u.a. die Transkription des „multidrug“ Transporters *PDR12*. Die am stärksten herunterregulierten Gene innerhalb der hier vorgestellten Gruppe von 85 Kandidatengenen codierten für Dehydrogenasen, Proteine mit FAD-bindender Domäne, Proteine mit TMD, Hydrolasen und Proteine mit unbekannter Funktion. In *S. cerevisiae* existierten für diese Proteine keine Orthologen. Nicht zuletzt waren die Transkriptgehalte von *AZR1* selbst in den durch Southern Hybridisierung bestätigten $\Delta azr1$ -Mutanten gänzlich herunterreguliert, was ein weiterer Beweis für die erfolgreiche Deletion war. Zwei der Gene, die unter beiden Versuchsbedingungen als DEGs gefunden wurden, waren allerdings unter Standardbedingungen besonders stark im Vergleich zum Wildtyp herunterreguliert. FGRAMPH1_1G27719 codierte für eine PKS in dem SMC 53 und FGRAMPH1_01G09147 codierte für eine Amidohydrolase.

Von besonderem Interesse waren jedoch die 442 Gene, deren Transkriptgehalte ausschließlich unter Fungizid-Stress in beiden $\Delta azr1$ Mutanten signifikant unterschiedlich zum Wildtyp reguliert waren (Abb. 13B, Tab. E2). 28 Gene wiesen in beiden unabhängigen Mutanten einen log₂FC von ≥ 1.5 auf, wobei 13 Gene (46 %) hypothetische Proteine ohne bekannte Domänen codierten. Sechs Gene (21 %) gehörten SMCs an und 6 Gene (21 %) hatten eine TMD. Unter diesen befinden sich die vier heraufregulierten Transportergene FGRAMPH1_01G15627 (ABC-Transporter, SMC C16), FGRAMPH1_01G16877 (MFS-Transporter), FGRAMPH1_01G18793 (MFS-Transporter, SMC C34) und

FGRAMPH1_01G09633 (ABC-Transporter). FGRAMPH1_01G15627 codierte das bereits genannte ABC-Transportergen *ABC3* und FGRAMPH1_01G09633 *PDR5*, einen weiteren ABC-Transporter, welcher in *S. cerevisiae* bereits mit Fungizidresistenz assoziiert wurde (Anderson et al. 2003; Harris et al. 2021). Interessanterweise war auch FGRAMPH1_01G15629 in den $\Delta azr1$ Mutanten signifikant stärker hochreguliert als im Wildtyp. Dieses Gen, das im Genom in direkter Nachbarschaft zu *ABC3* im SMC 16 liegt, codiert einen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor. Abermals codierten viele der nur unter Fungizid-Stress deregulierten 28 DEGs für kleine (AS 54 bis 198) Proteine und nur einige für Proteine mit bis zu 300 AS. Viele dieser Gene kamen ausschließlich in *F. graminearum* vor und besaßen keine orthologe Gene in anderen Organismen. Einige wiesen orthologe Gene in *F. culmorum* auf und wenige hatten orthologe Gene in vielen *Fusarium* spp. FGRAMPH1_01G08357 codiert für ein unbekanntes Protein aus der YjgF/YER057c/UK114 Familie und hat besonders viele orthologe Gene, die interessanterweise oft in der zu den Basidiomyceten gehörenden Klasse der Agaricomycetes gefunden wurden.

Um der Frage nachzugehen, ob Azr1 tatsächlich die Transkription überdurchschnittlich vieler kleiner Proteine (≤ 300 AS) reguliert, wurde die Anzahl an AS aller deregulierter Gene in den beiden $\Delta azr1$ Mutanten dahingehend betrachtet. Dabei zeigte sich, dass 25 % der Proteine aus ≤ 300 AS (11.4 % mit Signalpeptid (SP)) bestanden. Allerdings stellte es sich heraus, dass die Gesamtanzahl aller Proteine mit ≤ 300 AS im Genom von *F. graminearum* ebenfalls circa 25 % ausmachten. Somit lag bei den DEGs keine offensichtliche Anreicherung von kleinen Proteinen vor. Bei Effektoren handelt es sich oft um kleine, putativ sekretierte Cystein-reiche Proteine (Brown et al. 2012b; Brown et al. 2017; Lu and Edwards 2016). In den $\Delta azr1$ Mutanten waren 17 Gene für putativ sekretierte Effektoren im Vergleich zum Wildtyp dereguliert. Davon waren 13 Gene hochreguliert (FGRAMPH1_01G16217, FGRAMPH1_01G15939, FGRAMPH1_01G21173, FGRAMPH1_01G12903, FGRAMPH1_01G11435, FGRAMPH1_01G11953, FGRAMPH1_01G19127, FGRAMPH1_01G22907, FGRAMPH1_01G11901, FGRAMPH1_01G06917, FGRAMPH1_01G18805, FGRAMPH1_01G19603, FGRAMPH1_01G25985) und zwei weitere Gene waren herunterreguliert (FGRAMPH1_01G08497, FGRAMPH1_01G13765).

Beim Vergleich der nicht-induzierten zu den mit Tebuconazol behandelten Stämmen (Ansatz 2) waren 24 Gene sowohl im Wildtyp als auch in den beiden unabhängigen $\Delta azr1$ Mutanten signifikant dereguliert waren (Abb. 14B, Tab. E2). Nach Anwendung eines \log_2FC von ≥ 1 blieben 10 Gene übrig, welche bis auf einen Fall (FGRAMPH1_01G15627) in beiden unabhängigen Mutanten signifikant stärker hochreguliert waren, als dies im Wildtyp der Fall war. Drei Gene liegen in SMCs (SMC 14, 16 und 67). Sieben Gene codierten für Proteine mit TMD, darunter zwei Gene aus SMCs. Dazu gehörten die beiden bereits oben erwähnten ABC-Transporter *ABC3* (FGRAMPH1_01G15627) und *PDR5* (FGRAMPH1_01G09633). Außerdem waren die beiden Ergosterolbiosynthesegene *ERG24* und *ERG3*

deutlich stärker hochreguliert als im Wildtyp. Von den 10 hier betrachteten DEGs war FGRAMPH1_01G06405 das am stärksten hochregulierte Gen. Es codierte für ein Cytochrom P450 und könnte somit an der Oxidation von Fettsäuren und Steroiden involviert beteiligt sein, wie z.B. Ergosterol. FGRAMPH1_01G06405 könnte aus diesem Grund ebenfalls in die Ergosterolbiosynthese involviert sein. Ferner könnte FGRAMPH1_01G27401, eine Ketopantoathydroxylmethyltransferase, ebenfalls an der Ergosterolbiosynthese beteiligt sein. Dieses Enzym ist in Pilzen essenziell für die Biosynthese von Coenzym A und deshalb zum einen für die Synthese und Oxidation von Fettsäuren, welche u. a. Bestandteil in Membranlipiden sind, und zum anderen ist es für die Energieproduktion durch die Oxidation von Pyruvat im Zitronensäurezyklus wichtig. Das Genprodukt von FGRAMPH1_01G06947 scheint ebenfalls mit der Membran assoziiert zu sein. Es verfügt über eine *Marvel* Domäne, welche funktionell mit Sterol-reichen Membranablagerungen in Verbindung gebracht wird (Sánchez-Pulido et al. 2002).

Von den 56 Genen, welche ausschließlich in den beiden unabhängigen $\Delta azr1$ Mutanten als Reaktion auf den Fungizid-Stress (Ansatz 2) signifikant differentiell reguliert waren, wiesen 36 Gene in beiden unabhängigen $\Delta azr1$ Mutanten einen \log_2FC von ≥ 1 auf (Abb.14B, Tab. E2). Von diesen 36 Genen waren 10 Gene (28 %) SMCs zugeordnet (5 hochreguliert, 5 runterreguliert). Interessanterweise stammten die fünf runterregulierten Gene alle aus dem SMC 42, welcher für Fusarin C codiert (siehe 4.3.2.3). Ein hochreguliertes Gen (FGRAMPH1_01G12233) codierte vermutlich für eine Polyketidsynthase (PKS) und ist möglicherweise an der Biosynthese von Sekundärmetaboliten beteiligt, obwohl es keinem der bekannten SMC zugeordnet werden kann. Des Weiteren waren acht Ergosterolbiosynthesegene in den $\Delta azr1$ Mutanten stärker als im Wildtyp exprimiert (siehe 4.3.2.4). Ein weiteres hochreguliertes Gen (FGRAMPH1_01G13023) codiert wahrscheinlich für ein Cytochrom P450 Enzym und könnte vielleicht an der Ergosterolbiosynthese beteiligt sein. Das gleiche gilt für das Gen *EBDP1* (FGRAMPH1_01G20829). Dieses enthielt eine EXPERA Domäne, welche vermutlich Sterol-Isomerase Aktivität aufweist und eine Rolle in der Ergosterolbiosynthese spielen könnte (Sanchez-Pulido and Ponting 2014). Die folgenden fünf Gene könnten zudem im Zusammenhang mit Fungizidresistenz von Interesse sein: FGRAMPH1_01G24999, FGRAMPH1_01G00633, FGRAMPH1_01G16537, FGRAMPH1_01G17649 und FGRAMPH1_01G25039, zumal sie bisher nicht in Pflanzenpathogenen charakterisiert wurden. FGRAMPH1_01G24999 codiert für einen ABC-Transporter, welcher Ähnlichkeiten zu dem *STE6* Gen in *S. cerevisiae* aufweist und als multi-Resistenz Protein bekannt ist (McGrath and Varshavsky 1989). FGRAMPH1_01G00633 verfügte über eine Chloramphenicol-Acetyltransferase-ähnliche Domäne, welche in Bakterien im Zusammenhang mit der Inaktivierung des Antibiotikums Chloramphenicol genannt wurde (Shaw 1983). Bei FGRAMPH1_01G16537 handelt es sich um ein, mit den Sulfotransferasen entfernt verwandtes Protein,

welches in *S. mansonii* an der Resistenz gegenüber Oxamniquin beteiligt ist (Valentim et al. 2013). Ein RTA-ähnliches Gen (FGRAMPH1_01G17649) könnte wie in *S. cerevisiae* mit der Resistenzentwicklung gegenüber 7-Amino-cholesterol und dem Lipidtransport in Verbindung stehen (Soustre et al. 1996; Makuta et al. 2016). Das hauptsächlich in *Fusarium* spp. konservierte Gen FGRAMPH1_01G25039 besitzt eine Aminoglycosid-Phosphotransferase Domäne. Diese ist von Antibiotikaresistenzproteinen aus Bakterien bekannt und inaktiviert Antibiotika durch Phosphorylierung (Trower and Clark 1990). Mit am stärksten hochreguliert war ein Gen (FGRAMPH1_01G25277) für eine unbekannte Oxidoreduktase, welches auch in den *azr1*^{S368Y} Mutanten hochreguliert war, wenngleich auch in schwächerem Maße.

4.3.2.3 Azr1 kontrolliert die Expression von Sekundärmetabolit-Clustern

In dem Genom von *F. graminearum* codieren 69 Gen-Cluster für die Synthese von Sekundärmetaboliten (Sieber et al. 2014). Die oben beschriebene Auswertung der RNAseq Experiment zeigte, dass in beiden *azr1*^{S368Y} Mutanten Gene aus 19/69 SMCs (27.5 %) und in den Δ *azr1* Mutanten Gene aus 56/69 SMCs (81.1 %) signifikant dereguliert und auf Genomebene überproportional betroffen waren (Abb. 15). Gene von 16 dieser SMCs waren sowohl in den *azr1*^{S368Y} Mutanten als auch in den Δ *azr1* Mutanten dereguliert. Die strukturell bekannten Metabolite dieser 16 SMC waren Aurofusarin (SMC 13), Orcinol/orsellinic acid (SMC 18), Ferricrocin (SMC 33), Fusarin C (SMC 42) und Malonichrome (SMC 63). Einige Gene von drei SMCs (SMC 4, 10 und 57) waren ausschließlich in beiden *azr1*^{S368Y} Mutanten dereguliert. Demgegenüber waren Gene von 40 SMCs spezifisch in beiden Δ *azr1* Mutanten dereguliert. Dabei waren ein oder mehrere Gene pro SMC dereguliert. Darunter waren u. a. die SMCs für die Biosynthese von Zearalenon (C15) und Trichothecene (C23). Nur bei 10 der 69 SMCs war keines der dort liegenden Gene weder in den *azr1*^{S368Y} Mutanten noch in den Δ *azr1* Mutanten dereguliert.

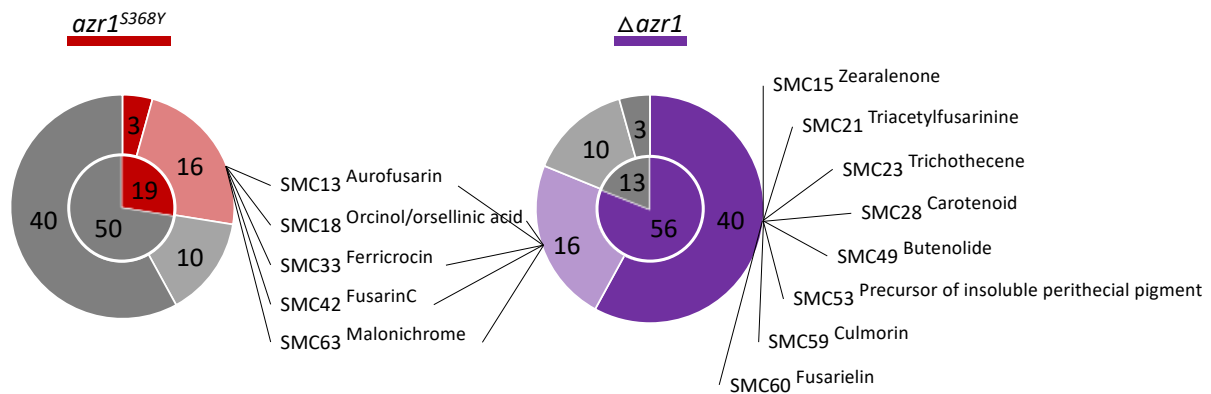


Abbildung 15: Die Expression von vielen Genen in SMCs ist sowohl in den *azr1^{S368Y}* Mutanten als auch in den $\Delta azr1$ Mutanten verändert.

Die beiden Kreisdiagramme stellen die Anzahl von SMCs dar, die DEGs enthalten (rot / violett) oder nicht (grau). Dabei galt ein SMC als beeinträchtigt, sobald die Transkriptgehalte eines seiner Gene in jeweils beiden Mutanten signifikant dereguliert waren. In den *azr1^{S368Y}* Mutanten (links) enthielten 19 SMCs (dunkel-rot) DEGs und 50 SMCs (dunkel-grau) keine DEGs. Von den 19 SMCs enthielten 16 SMCs (hell-rot) auch in den $\Delta azr1$ Mutanten (rechtes Diagramm; hell-violett) DEGs, während 3 SMCs (dunkel-rot) ausschließlich in den beiden *azr1^{S368Y}* Mutanten betroffen waren. Von den 50 SMCs in den *azr1^{S368Y}* Mutanten ohne DEGs enthielten 10 SMC (hell-grau) auch in den $\Delta azr1$ Mutanten keine DEGs. 40 SMC (dunkel-grau) enthielten nur in den beiden *azr1^{S368Y}* Mutanten keine DEGs. 40 (rechtes Diagramm; violett) der insgesamt 56 SMCs, welche in den $\Delta azr1$ Mutanten DEGs enthielten, traten nur hier, aber nicht in den *azr1^{S368Y}* Mutanten auf. In den $\Delta azr1$ Mutanten gab es 13 SMCs (dunkelgrau), die keine DEGs enthielten, von denen drei (dunkelgrau) ausschließlich hier auftraten. SMCs, die DEGs enthielten und von denen die synthetisierten Metabolite bekannt sind, sind mit SMC-Nummer und Metabolit-Bezeichnung dargestellt.

Insgesamt liegen 902 Gene in den 69 SMCs (Tab. 2). Von diesen waren die Transkriptgehalte von 177 Genen (19.6 %) signifikant dereguliert. Davon waren 45 Gene (5 %) in den beiden *azr1^{S368Y}* Mutanten und 156 Gene (17.3 %) in den beiden $\Delta azr1$ Mutanten betroffen. 24 Gene waren sowohl in den *azr1^{S368Y}* Mutanten als auch in den $\Delta azr1$ Mutanten betroffen (Tab. 2, Tab. E3 und E4). Während die 45 SMC-Gene in den *azr1^{S368Y}* Mutanten ausschließlich als Reaktion auf Fungizid-Stress dereguliert waren, so war die Mehrheit der 156 SMC-Gene in den $\Delta azr1$ Mutanten nur unter Standardbedingungen dereguliert (Tab. 2, Abb. 16 A). Nur 28 % dieser 156 SMC-Gene in den $\Delta azr1$ Mutanten waren im Zusammenhang mit Fungizid-Stress dereguliert (Tab. 2).

Die farbcodiert dargestellten Transkriptgehalte der in den 69 SMCs liegenden 902 Gene zeigten deutlich, dass der Sekundärmetabolismus in den *azr1^{S368Y}* Mutanten bemerkenswerterweise betroffen war, aber noch umfassender in den Δ *azr1* Mutanten (Abb. 16 A). Die Transkriptgehalte der SMC-Gene waren in den *azr1^{S368Y}* Mutanten als Reaktion auf Fungizid-Stress stärker dereguliert als im Wildtyp, in den Δ *azr1* Mutanten dagegen stärker unter Standardbedingungen im Vergleich zum Wildtyp. In etwas schwächerem Maße war dies allerdings auch bei der Fungizidanwendung der Fall. Gemessen an der Anzahl der deregulierten Gene pro SMC stachen der Aurofusarin- (C13) und der Fusarin C-SMC (C42) sowohl in den *azr1^{S368Y}* Mutanten als auch in den Δ *azr1* Mutanten deutlich hervor.

In den beiden unabhängigen *azr1^{S368Y}* Mutanten waren acht von 20 SMC-Genen des Aurofusarin-SMCs als Reaktion auf Fungizid-Stress übereinstimmend signifikant stärker herunterreguliert und eines stärker heraufreguliert als im Wildtyp (Abb. 16 B, Tab. E3). Fungizid-Stress führte in den *azr1^{S368Y}* Mutanten demnach zu einer stärkeren Herunterregulierung dieses SMCs als im Wildtyp. In den Δ *azr1* Mutanten waren fünf von 20 SMC-Genen von C13 in beiden unabhängigen Mutanten und weitere acht Gene jeweils nur in einer der beiden unabhängigen Mutanten signifikant dereguliert (Abb. 16B, Tab. E4). Sowohl unter Standardbedingungen als auch unter Fungizid-Stress war die Mehrheit dieser Gene im Vergleich zum Wildtyp stärker hochreguliert, was auf eine höhere Aurofusarinproduktion hindeutete. Fungizidanwendung führte in allen Stämmen dazu, dass C13 herunterreguliert wurde (Abb. 16 B).

Ein ähnliches Bild zeigte sich auch für den Fusarin C SMC. Auch C42 wurde als Reaktion auf Fungizid-Stress in den *azr1^{S368Y}* Mutanten stärker herunterreguliert als im Wildtyp. In den Δ *azr1* Mutanten war C42 unter Standardbedingungen stärker hochreguliert, wurde aber auch hier als Reaktion auf Fungizid-Stress stärker herunterreguliert als im WT (Abb. 16 C).

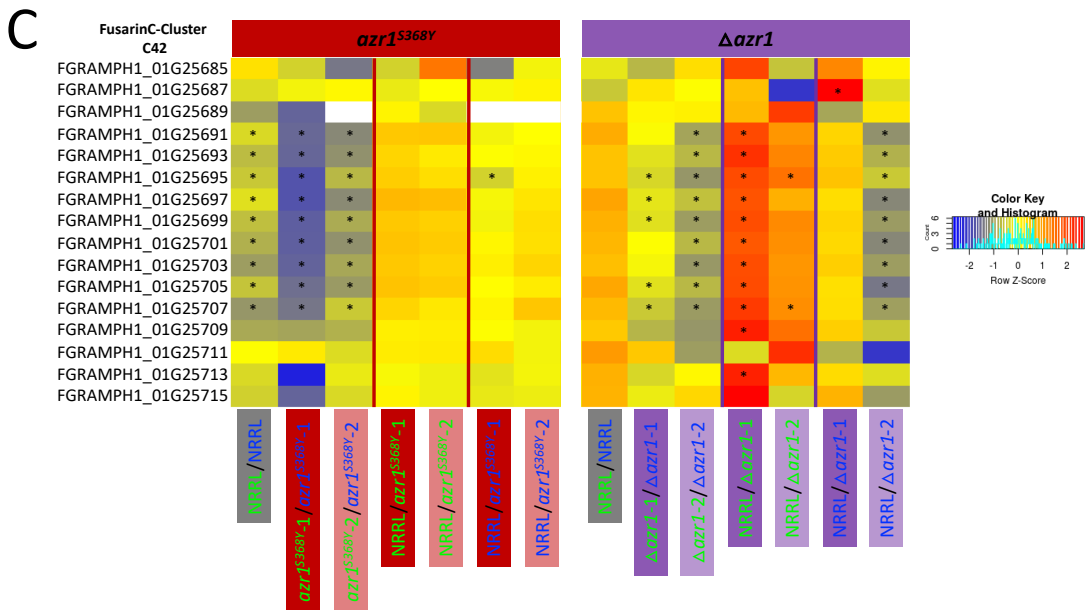
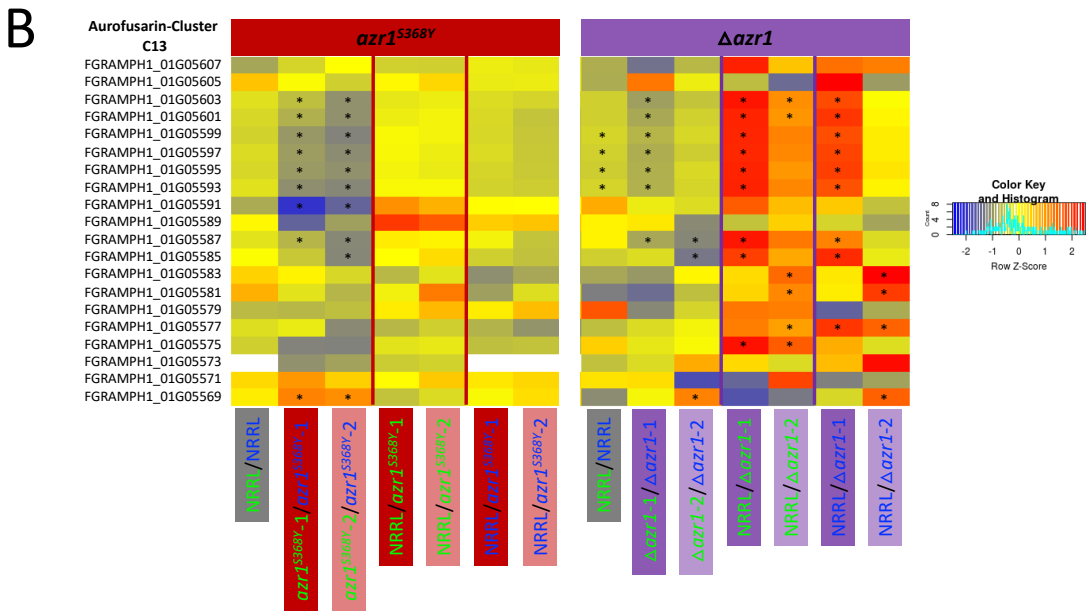
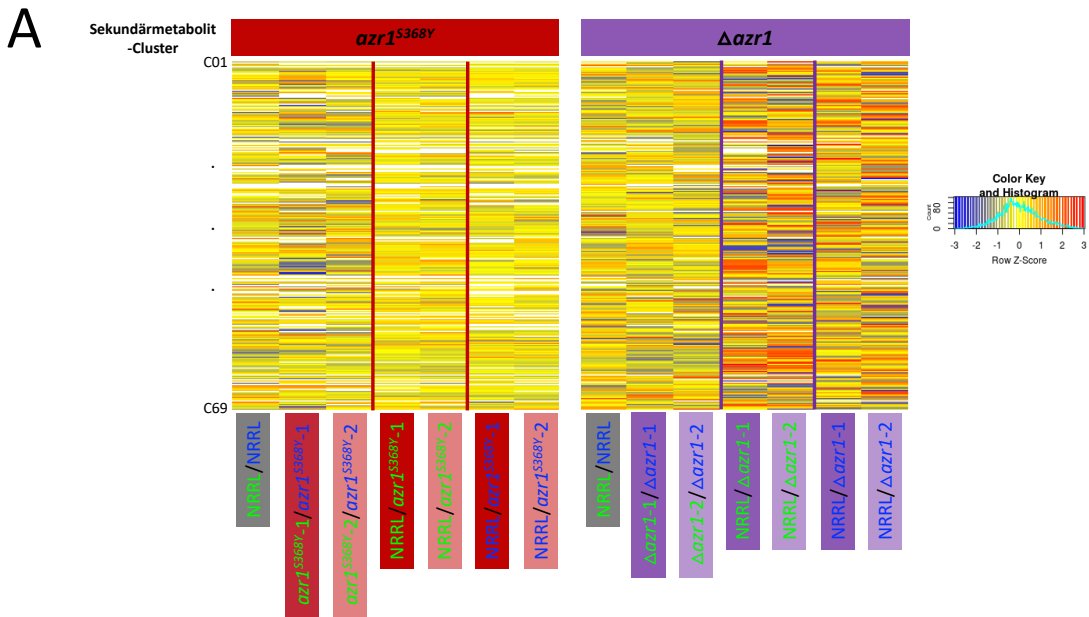


Abbildung 16: Visualisierung des Einflusses von Azr1 auf die Transkriptgehalte von Sekundärmetabolit-Clustern anhand von Heatmaps.

- (A) Übersichtsdarstellung der Transkriptgehalte der in den 69 SMCs liegenden 902 SMC-Gene. Links sind die Ergebnisse für die *azr1*^{S368Y} Mutanten (rot) und rechts jene für die Δ *azr1* Mutanten (violett) dargestellt. Dabei zeigen die ersten drei Vergleiche die Transkriptgehalte als Reaktion auf Fungizid-Stress von Wildtyp und den beiden *azr1*^{S368Y} Mutanten bzw. den beiden Δ *azr1* Mutanten (Ansatz 1). Die folgenden vier Vergleiche zeigen die beiden *azr1*^{S368Y} Mutanten bzw. die beiden Δ *azr1* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp unter Standardbedingungen und unter Fungizid-Stress (Ansatz 2).
- (B) Grafische Darstellung der Transkriptgehalte der 20 SMC-Gene des Aurofusarin SMC (C13). Links sind die Ergebnisse für die *azr1*^{S368Y} Mutanten (rot) und rechts jene für die Δ *azr1* Mutanten (violett) dargestellt. Dabei zeigen die ersten drei Vergleiche die Transkriptgehalte als Reaktion auf Fungizid-Stress von Wildtyp und den beiden *azr1*^{S368Y} Mutanten bzw. den beiden Δ *azr1* Mutanten (Ansatz 1). Die folgenden vier Vergleiche zeigen die beiden *azr1*^{S368Y} Mutanten bzw. die beiden Δ *azr1* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp unter Standardbedingungen und unter Fungizid-Stress (Ansatz 2). Sternchen symbolisieren eine signifikante ($p > 0,05$) Deregulierung des jeweiligen SMC-Gens in dem jeweiligen Vergleich.
- (C) Grafische Darstellung der Transkriptgehalte der 16 SMC-Gene des Fusarin C SMC (C42). Links sind die Ergebnisse für die *azr1*^{S368Y} Mutanten (rot) und rechts jene für die Δ *azr1* Mutanten (violett) dargestellt. Dabei zeigen die ersten drei Vergleiche die Transkriptgehalte als Reaktion auf Fungizid-Stress von Wildtyp und den beiden *azr1*^{S368Y} Mutanten bzw. den Δ *azr1* Mutanten (Ansatz 1). Die folgenden vier Vergleiche zeigen die beiden *azr1*^{S368Y} Mutanten bzw. die beiden Δ *azr1* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp unter Standardbedingungen und unter Fungizid-Stress (Ansatz 2). Sternchen symbolisieren eine signifikante ($p > 0,05$) Deregulierung des jeweiligen SMC-Gens in dem jeweiligen Vergleich.

Die Analyse der molekularen Funktionen aller in den Mutanten deregulierten SMC-Genen mit Hilfe der Gen-Ontologie Annotation (siehe 3.7.1) zeigte, dass im Fall der beiden *azr1^{S368Y}* Mutanten 71 % und im Fall der beiden Δ *azr1* Mutanten 56 % über eine derartige Annotation verfügten (Abb. 17 A). Sowohl in den beiden *azr1^{S368Y}* Mutanten als auch in den beiden Δ *azr1* Mutanten wiesen circa 60 % der Gene mit bekannter molekularer Funktion katalytische Aktivität auf. 15 % (*azr1^{S368Y}*) bzw. 25 % (Δ *azr1*) wiesen eine Transporter Aktivität auf und 10 % (*azr1^{S368Y}*) bzw. 13 % (Δ *azr1*) eine Transkriptions-regulatorische Aktivität (Abb. 17 B).

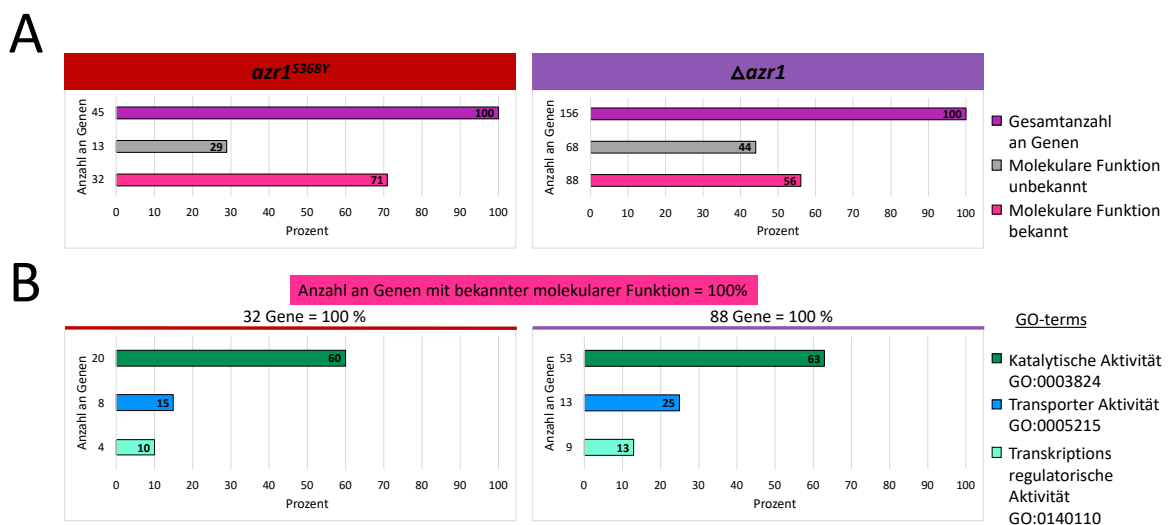


Abbildung 17: In der Gen-Ontologie Annotation dominieren bei den SMC-Genen der *azr1^{S368Y}* Mutanten und der Δ *azr1* Mutanten drei molekulare Funktionen.

- (A) Anzahl an SMC-Genen mit bekannter (pink) und unbekannter (grau) molekularer Funktion nach der Gen-Ontologie Annotation, die in den *azr1^{S368Y}* Mutanten (links) bzw. in den Δ *azr1* Mutanten (rechts) signifikant veränderte Transkriptgehalte aufwiesen.
- (B) Anteil von SMC-Genen mit katalytischer Aktivität (grün), Transporter Aktivität (blau) und Transkriptions-regulatorischer Aktivität (türkis) an der Anzahl der SMC-Gene mit bekannter molekularer Funktion. Links dargestellt für die *azr1^{S368Y}* Mutanten (rot) und rechts für die Δ *azr1* Mutanten (violett).

4.3.2.4 Azr1 kontrolliert die Expression von Genen der Ergosterolbiosynthese

Zahlreiche Gene der Ergosterolbiosynthese wurden unter Azol-Fungizid-Stress sowohl im Wildtyp als auch in den Mutanten signifikant hochreguliert (Tab. E5). Die Hochregulierung von Genen der Ergosterolbiosynthese im Wildtypstamm stellte eine typische Reaktion auf die Anwendung von Sterolbiosyntheseinhibitoren dar, die schon in früheren Arbeiten beschrieben wurde (Yang et al. 2015; Becher et al. 2010). Darüber hinaus wiesen die Mutanten in der hier vorgelegten Arbeit im Vergleich zum Wildtyp Unterschiede hinsichtlich der transkriptionellen Regulation der Ergosterolbiosynthesegene auf. In den beiden *azr1^{S368Y}* Mutanten waren die folgenden Gene signifikant weniger hochreguliert als im Wildtyp: *ERG1*, *ERG2* und *ERG13*. Im Vergleich zum Wildtyp waren *ERG8*, *ERG6b* und *ERG11/CYP51A* signifikant stärker hochreguliert. Ebenfalls war der ABC-

Transporter *PDR5*, welcher am Steroid-Transport beteiligt ist, in den beiden *azr1*^{S368Y} Mutanten signifikant stärker hochreguliert als im Wildtyp. Interessanterweise waren die Transkriptgehalte von Genen der Ergosterolbiosynthese in beiden Δ *azr1* Mutanten bei deutlich mehr Genen signifikant stärker hochreguliert als im Wildtyp. Dies betraf *ERG1*, *ERG2*, *ERG3b*, *ERG4*, *ERG5a*, *ERG7*, *ERG8*, *ERG10a* und *ERG13*. Auch waren im Vergleich zu den *azr1*^{S368Y} Mutanten mehr Gene signifikant höher exprimiert als im Wildtyp. Zu diesen zählten die beide *ERG6* Gene, *ERG11/CYP51B* und *ERG11/CYP51A*, *ERG24b*, *ERG27* und *PDR5* (Tab. E5).

4.3.2.5 Die Expression von Azr1 im Zusammenhang mit Fungizid-Stress

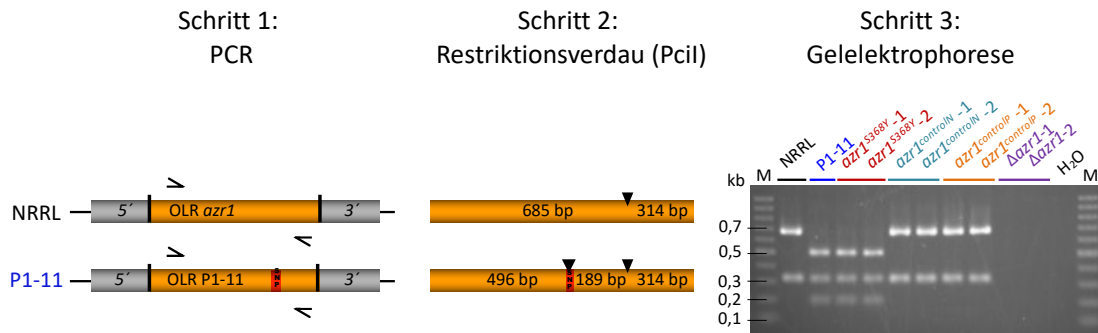
Das RNAseq Experiment hat deutlich gezeigt, dass das in dieser Arbeit behandelte Kandidatengen *AZR1* (FGRAMPH1_01G12517) selbst sowohl im Wildtyp als auch in den *azr1*^{S368Y} Mutanten unter Fungizid-Stress signifikant hochreguliert wurde. Interessant war zudem, dass das direkt benachbarte Gen FGRAMPH1_01G12519 (siehe 4.3.2.1 und 4.3.2.2) in der *azr1*^{S368Y}-1 Mutante als Reaktion auf Fungizid-Stress ebenfalls stärker hochreguliert wurde als dies im Wildtyp der Fall war. Allerdings war der *p*-Adjusted Wert des log2FC des Wildtyps größer als 0,05 und eine endgültige Aussage kann somit nicht getroffen werden. Ähnliches galt für die zweite unabhängige *azr1*^{S368Y} Mutante. Aber auch in den beiden Δ *azr1* Mutanten war dieses Gen unter Standardbedingungen und unter Fungizid-Stress signifikant stärker hochreguliert als im Wildtyp (Tab. E6).

4.4 CAPS Marker Test und dessen Bedeutung für die Untersuchung von Feldisolaten

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die im Labor eingeführte Punktmutation im *AZR1* Gen die Toleranz gegenüber Azol-Fungiziden signifikant erhöht, ohne für den Pilz von Nachteil zu sein, soweit es hier getestet werden konnte. Allerdings könnten andere Merkmale im Feld wichtig sein, wie z.B. die Produktion von Mykotoxinen, von denen die meisten bei *F. graminearum* strukturell nicht bekannt sind und somit nicht bestimmt werden können. Diese und weitere Merkmale können aber im Feld einen Einfluss auf die Ausbreitung von Mutationen haben, die zu einer erhöhten Azol Toleranz führen. Um einen Einblick in das Auftreten des SNPs S368Y in *AZR1* in Feldpopulationen zu erhalten, wurde ein spezifischer CAPS Marker Test (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) entwickelt, der in DNA-Proben die Codons des WT (tcc) und der SNP-Mutanten (tac) eindeutig voneinander unterscheiden kann. Die Methode wurde zunächst mit den in dieser Arbeit verwendeten Isolaten evaluiert. Im Fall des Wildtypisolates NRRL 13383 und der beiden Kontrolltransformanten *azr1*^{controlN} und *azr1*^{controlP} enthielten die PCR-Produkte nur eine *PciI* Schnittstelle, wodurch im Gel zwei Banden zu sehen sind (Abb. 18 A). Das PCR-Produkt des Azol-toleranten P1-11 Isolates und das der beiden *azr1*^{S368Y} Mutanten

enthielt dagegen zwei *PciI* Schnittstellen, wobei eine genau im hier untersuchten SNP lag, was zu drei Fragmenten führte (Abb. 18 A). Da in den $\Delta azr1$ Mutanten der ORF deletiert war, innerhalb dem die verwendeten Primer banden, entstand kein PCR-Produkt. Die Testung von NRRL 13383 und der Laborisolate führte in allen Fällen zu den vorhergesagten Ergebnissen (Abb. 18 A).

A



B

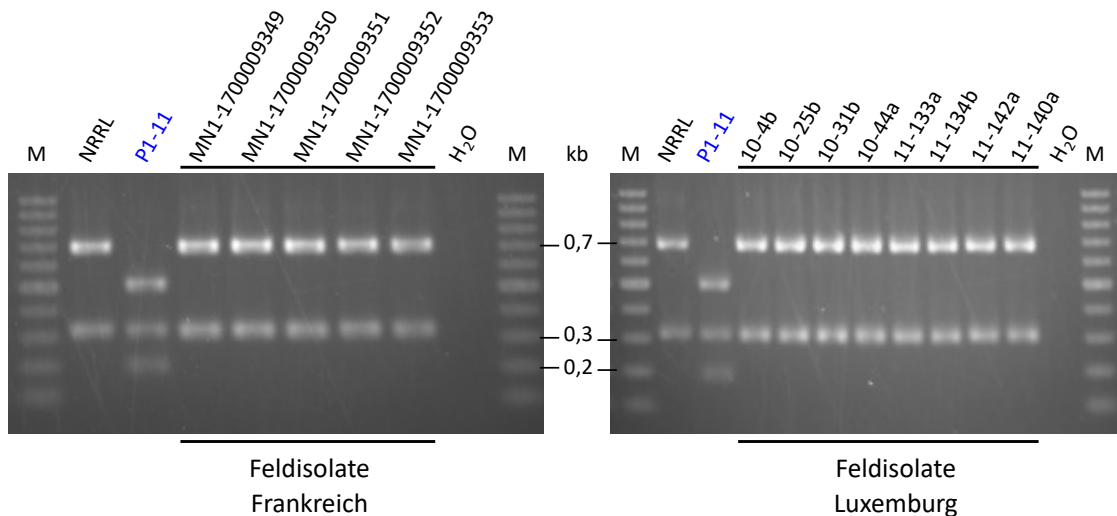


Abbildung 18: Anwendung des CAPS Marker Verfahrens zur Testung von Feldisolaten auf das Vorhandensein des SNPs in *AZR1*.

- (A) Validierung des Nachweises, welcher in drei Schritten ausgeführt wird. Im ersten Schritt erfolgt außer bei den $\Delta azr1$ Mutanten die Amplifikation eines Großteiles des *AZR1* ORF. Im zweiten wird dieses PCR-Produkt durch das Restriktionsenzym *PciI*, in Abhängigkeit von der Anzahl der vorhandenen Schnittstellen, in zwei bzw. drei Fragmente gespalten. Schließlich werden diese Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt.
- (B) CAPS Marker Test von Feldisolaten. Links ist das Ergebnis von in Frankreich isolierten Feldisolaten und rechts das Ergebnis luxemburgischer Feldisolate. Die Negativkontrolle zum Nachweis des untersuchten SNPs ist NRRL 13383, die Positivkontrolle P1-11.

Im Weiteren wurden fünf Feldisolate französischer Herkunft und acht Feldisolate aus Luxemburg getestet (Abb. 18 B). Die Isolate französischer Herkunft stammen aus den Jahren 2011 bis 2014 und wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Jochen Kleemann (Bayer AG Division Crop Science, Monheim, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Sie wurden von Winterweizen isoliert und gelten als leicht toleranter gegenüber Azol-Fungiziden, wobei eine *F. graminearum* sensu stricto Zuordnung und die Bestimmung des jeweiligen Chemotyps fehlte. Das Isolat mit der höchsten Toleranz hat einen ED₅₀ Wert von 0,43 gegenüber Prothioconazol. Die Isolate aus Luxemburg wurden zwischen 2008 und 2011 von Weizen isoliert und wurden dankenswerterweise von Herrn Dr. Marco Beyer (Luxembourg Institute of Science and Technology) zur Verfügung gestellt. Abgesehen vom Isolat 10-4b (3-ADON Chemotyp) haben alle anderen Isolate aus Luxemburg den 15-ADON Chemotyp. Das Isolat 10-4b hat mit einem ED₅₀ Wert von 0,002 gegenüber Tebuconazol den niedrigsten ED-Wert und das Isolat 11-134b mit einem ED₅₀ Wert von 0,019 den höchsten ED-Wert dieser acht Isolate. Sowohl in dem Gel der fünf Feldisolate französischer Herkunft als auch in dem Gel der acht Feldisolate aus Luxemburg waren immer nur zwei Banden zu sehen. Alle PCR-Produkte enthielten demnach nur eine *Pcil* Schnittstelle und keines der getesteten Feldisolate enthielt den SNP im *AZR1* Gen (Abb. 18 B). Zusammenfassend konnte mit Hilfe des CAPS Marker Tests gezeigt werden, dass dieses Testverfahren schnell und kostengünstig an Feldisolaten durchgeführt werden kann.

5 Diskussion

Circa 800 Millionen Menschen weltweit sind chronisch unterernährt (Meemken and Qaim 2018). Diese Problematik wird sich u.a. wegen des kontinuierlichen Anstiegs der Weltbevölkerung auch weiterhin verstärken und die verfügbare Ackerfläche pro Kopf weiter sinken lassen (Nations 2019; FAO 2018). In den letzten Jahrzehnten haben u. a. die synthetischen Pflanzenschutzmittel stark zu der Steigerung der Nahrungsmittelproduktion und -qualität beigetragen (Evenson and Gollin 2003; Meemken and Qaim 2018; Qaim 2017; Keulemans 2019; Anonymous 2000; Knutson 1997; Oerke and Dehne 2004; Jorgenson 1999; Rosling 2018; Deising et al. 2019). Allerdings haben sich weltweit zahlreiche Resistenzen gegenüber Fungiziden ausgebildet und zum Verlust ganzer Fungizidklassen für die Anwendung im Feld geführt (Hewitt 1998). Bereits 2 Jahre nach Markteinführung der Strobilurine führten Punktmutationen, mit der Konsequenz eines einzigen Aminosäureaustausches, in zahlreichen Pilzen zu dem kompletten oder teilweisen Verlust der Wirksamkeit dieser Fungizidklasse (Bartels 2000; Kim et al. 2003; Kröcher 2000; Lesemann et al. 2006). Sich derartig schnell entwickelnde Fungizidresistenzen gegenüber Azol-Fungiziden könnten besonders im Fall der Mykotoxin produzierenden *Fusarium*-Arten, wie z.B. *Fusarium graminearum*, schwerwiegende gesundheitliche sowie ökonomische Folgen haben (Eskola et al. 2020). Feldisolate mit einer reduzierten Sensitivität gegenüber Azol-Fungiziden existieren allerdings bereits (Deising et al. 2008). Diesen Resistenzen liegen unterschiedliche Mechanismen zugrunde, welche häufig in Kombination auftreten (Hollomon 1993; Yin et al. 2009; Klix et al. 2006; Becher and Wirsal 2012; Lucas et al. 2015). Von zentraler Bedeutung ist es, die diesen Mechanismen zugrundeliegenden Netzwerke und Verknüpfungen zu entschlüsseln. Hilfreich ist in diesem Zusammenhang, dass Azol-Resistenz auch unter Laborbedingungen induzierbar und somit studierbar ist (Becher et al. 2010). Azol-tolerante Isolate, die aus *in vitro* Adaptionsexperimenten hervorgegangen sind, wurden zusammen mit dem Fungizid-sensitiven Ursprungsisolat sequenziert. Bei diesen Untersuchungen wurden mehrere SNPs in unterschiedlichen Genen identifiziert. Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, im Detail herauszufinden, welche dieser SNPs Azol-Resistenz vermitteln und welche Mechanismen dieser Resistenz zugrunde liegen. Die in dieser Arbeit erzeugten Mutanten und Transformaten wurden aus diesem Grund hinsichtlich ihrer generellen Vitalität, ihrer Virulenz, ihrer Mykotoxinproduktion sowie ihrer Fungizid-Resistenz, analysiert. Dabei zeigt diese Arbeit erstmalig, dass ein einziger SNP innerhalb eines bisher unbekanntem Transkriptionsfaktors in der Lage ist, Azol-Resistenz in *F. graminearum* zu vermitteln. Transkriptomanalysen zeigen zudem die der Azol-Resistenz zugrundeliegende Komplexität der transkriptionellen Regulation.

5.1 Der uncharakterisierte Transkriptionsfaktor Azr1 ist innerhalb der *Fusarium*-Spezies hoch konserviert

Der in dieser Arbeit als Azr1 benannte uncharakterisierte Transkriptionsfaktor ist besonders stark innerhalb der *Fusarium*-Arten konserviert. Blast-Analysen unter Einbeziehung unterschiedlicher Vertreter aus den Abteilungen der Ascomycota und der Basidiomycota zeigten, dass alle anderen putativ orthologen Gene weniger als 50 % Identität zu FgAzr1 aufweisen. Dabei stammen die putativen orthologen Gene vor allem aus bodenbürtigen Pilzen mit teils saprophytischer Lebensweise von denen einige bereits als Produzenten toxischer Sekundärmetabolite bekannt sind (Kim and Shim 2019; Al-Fakih 2014; Došen et al. 2016; Dhodary et al. 2018). Orthologe des aus 722 Aminosäuren bestehenden Zn₂Cys₆-Transkriptionsfaktors Azr1 wurden bisher in keiner Pilzart charakterisiert. Zudem zeigten die Transkriptomanalysen dieser Arbeit, dass auch die Funktionen mehrerer Proteine, deren Gene vermutlich durch Azr1 transkriptionell reguliert werden, bislang ebenfalls unbekannt sind. Einige dieser Proteine sind klein, enthalten zumeist kein Signalpeptid und sind zudem fast ausschließlich innerhalb der *Fusarium* Spezies konserviert. Azr1 weist eine Zn₂Cys₆-pilztypische DNA-bindende Domäne und eine Transkriptionsfaktor Domäne auf, wobei erstere üblicherweise für die Erkennung der Bindestelle im Promotor und zweitere für die Bindung transkriptioneller Co-Regulatoren verantwortlich ist. Um die Funktionen von Azr1, sowie die Auswirkungen des sich im *AZR1* Gens befindenden SNP zu analysieren, wurden in dieser Arbeit vier unterschiedliche Konstrukte erzeugt, deren Integration in zwei *F. graminearum* Empfängerstämme über homologe Rekombination am Ziellocus erfolgte. Dies führte zu acht transgenen *F. graminearum* Stämmen. Zum einen wurde im Wildtypstamm NRRL 13383 der ORF von *AZR1* deletiert, zum anderen durch ein Allel ersetzt, welches den ursprünglich im Azol toleranten Laborisolat entdeckten SNP enthielt. Außerdem wurde im Wildtypstamm NRRL 13383 die Resistenzkassette an den ORF von *AZR1* gehängt, um zu bestätigen, dass diese keinen Einfluss auf den Phänotyp hat. Ferner wurde im P1-11 Isolat der ORF des P1-11 Isolates gegen den *AZR1* ORF des Wildtypstamms NRRL 13383 ausgetauscht, um zu testen welche Bedeutung den anderen SNPs im P1-11-Isolat im Zusammenhang mit Azol-Resistenz zukommt. Die Analyse der so gewonnenen Datensätze erlaubte phänotypische Veränderungen jeweils dem Genotyp der Deletion bzw. Punktmutation klar zu zuordnen, erste Hinweise auf die durch Azr1 regulierten Gene zu erhalten, sowie einen kausalen Einblick in die Entstehung der Azol Toleranz in P-11 zu gewinnen.

5.2 Charakterisierung von Azr1

5.2.1 Die vegetative Vitalität der AZR1 Mutanten ist unbeeinträchtigt

Eine erhöhte Toleranz gegenüber Fungiziden geht oftmals mit Vitalitätsverlusten einher (Lysøe et al. 2011; Hagiwara et al. 2017). Dabei können z. B. Probleme mit der Sporulation und Keimung von Mikro- und Makrokonidien, als auch Probleme mit dem Myzelwachstum auftreten. Die in dieser Arbeit durchgeführten Wachstumsexperimente zeigten interessanterweise in keiner der getesteten Mutanten und Transformaten auf keinem der verschiedenen Substrate und bei keiner der getesteten Temperaturen signifikante Abweichungen vom Wildtyp oder von dem Azol toleranten P1-11 Isolat. Auch auf mikroskopischer Ebene wurden bei den Mutanten keine qualitativen Veränderungen bei den vegetativen Hyphen hinsichtlich ihres Durchmessers, der Segmentlänge und ihrer Verzweigung gefunden. Ebenso wenig war ihre Fähigkeit zur Bildung sexueller und asexueller Sporen beeinträchtigt. Dabei traten weder Mengenunterschiede noch Veränderungen hinsichtlich der Keimung, der Länge, der Krümmung oder der Septierung auf. Dies bedeutet, dass weder der Verlust von *AZR1* noch die Einführung des Einzelnukleotidaustausches das Wachstum oder die Sporulation unter den getesteten Bedingungen beeinflussten. Diese Ergebnisse sind von Bedeutung, da zahlreiche Studien von Transkriptionsfaktoren, welche Azol Toleranz beeinflussen, derartige Defekte schildern. So weisen z.B. Deletionsmutanten des Transkriptionsfaktors *AtrR* aus *Aspergillus fumigatus* ein vermindertes vegetatives Wachstum auf (Hagiwara et al. 2017). Auch für das Ortholog *ATRR* in *F. graminearum* wurde ein Einfluss auf das vegetative Wachstum, die Sporenproduktion und die Perithezienbildung gezeigt (Zhao et al. 2022b). Ebenso zeigen Deletionsmutanten in *F. graminearum* für den Transkriptionsfaktor *FgSR* Wachstumsdefizite (Liu et al. 2019). In den Deletionsmutanten für den Transkriptionsfaktor *FgStuA* ist dagegen die Sporenproduktion signifikant vermindert. Außerdem unterbleibt in diesen die Perithezien- und Ascosporenentwicklung sowie die Bildung von Konidien (Lysøe et al. 2011). Ebenfalls wurde gezeigt, dass einzelne Aminosäureaustausche in Transkriptionsfaktoren, wie *Upc2* in *S. cerevisiae* und *Candida glabrata*, z.B. zu einer verzögerten Filamentation führen können (Lohberger et al. 2014). Vor diesem Hintergrund und im Zusammenhang mit der Frage, ob ein solcher Azol Toleranz vermittelnder Einzelnukleotidaustausch auch unter Feldbedingungen auftreten könnte, ist der Befund, dass weder der Verlust von *AZR1* noch die Einführung des Einzelnukleotidaustausches die vegetative Vitalität beeinträchtigen umso interessanter.

5.2.2 AZR1 Mutanten sind virulent und beeinflussen die Transkription von Sekundärmetabolit-Genen

Die Fähigkeit zur Penetration und Kolonisierung des Wirtes ist für Pathogene zur Vollendung ihres Lebenszyklus und infolgedessen für ihre Vermehrung und Verbreitung unverzichtbar. Allerdings weisen Isolate mit einer erhöhten Toleranz gegenüber Fungiziden oftmals eine verminderte Virulenz auf. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit drei unterschiedliche Virulenztests durchgeführt, um eine etwaige Verminderung der Virulenz in den Mutanten zu erfassen. Die Inokulation von verwundeten Maisstängeln stellte eine quantitative Methode dar, um unabhängig von einer Druckvermittelten Penetration und der enzymatischen Lyse der Cuticula und Zellwand die Fähigkeit der Isolate zu testen, das Wirtsgewebe zu besiedeln. Bis auf die $\Delta azr1$ Mutanten waren alle Mutanten und Transformaten gleich virulent wie die beiden Referenzisolate. Die beiden unabhängigen $\Delta azr1$ Mutanten zeigten dagegen eine leicht erhöhte Virulenz, was aber nur in einer der beiden Mutanten statistisch signifikant war. In einem weiteren Test wurde die Virulenz auf Weizenblütchen getestet, was zeigte, dass keine der Mutanten oder Transformaten schwächer virulent als die beiden Referenzisolate war. Wurden die Weizenähren dagegen zum Zeitpunkt der Blüte, zwei Tage vor Inokulation mit dem Tebuconazol haltigen Fungizid Ballet behandelt, infizierten die $azr1^{S368Y}$ Mutanten, sowie das P1-11 Isolat mehr Blütchen pro Ähre als das Wildtypisolat. Obgleich dieser Unterschied auf Grund der Streuung der Daten nicht signifikant war, so deutet das Ergebnis dennoch darauf hin, dass der hier untersuchte SNP im AZR1 Gen auch während einer Infektion der Wirtspflanze eine erhöhte Azol-Toleranz vermittelt.

In der Literatur gibt es zahlreiche Beispiele, in denen Deletionsmutanten von Transkriptionsfaktoren und Mutanten mit Aminosäureaustauschen in Transkriptionsfaktoren eine herabgesetzte Virulenz zeigen. Die Deletionsmutanten von *SREA*, *SREB* aus *P. digitatum* und *ATRR* aus *F. graminearum* und *A. fumigatus* stehen nur stellvertretend für diese (Liu et al. 2015a; Ruan et al. 2017; Hagiwara et al. 2017; Zhao et al. 2022b). In *Upc2* aus *C. glabrata* verringert die Einführung von zwei Aminosäureaustauschen die Virulenz ebenfalls signifikant (Lohberger et al. 2014). Aber es existieren auch andere Studien, in denen die Einführung eines Aminosäureaustausches in einen Transkriptionsfaktor keinen Effekt auf die Virulenz hat. Die beiden Transkriptionsfaktoren *Mrr1* aus *C. albicans* und *B. cinerea*, sowie *Tac1* aus *C. albicans* sind Beispiele dafür (Morschhäuser et al. 2007; Kretschmer et al. 2009; Coste et al. 2004; Coste et al. 2007). Ebenso hat interessanterweise auch die Einführung des Aminosäureaustausches in *Azr1* keinen Einfluss auf die Virulenz. Und eine Studie aus *A. fumigatus* zeigte sogar, dass die Deletion des Transkriptionsfaktors *HBXA* zu erhöhter Virulenz und zu reduzierten SM-Gehalten führt (Satterlee et al. 2020).

Zahlreiche Studien beweisen einen engen Zusammenhang zwischen Virulenz und Sekundärmetabolit- bzw. Mykotoxinproduktion. So produzieren Deletionsmutanten des Transkriptionsfaktors *FgSR* weniger DON und sind schwächer virulent (Liu et al. 2019). Auch *STUA*-Deletionsmutanten in *F. graminearum* und in *A. flavus* weisen neben einer verringerten Virulenz eine niedrigere SM-Produktion auf (Lysøe et al. 2011; Yao et al. 2017).

In der hier vorliegenden Arbeit waren in den $\Delta azr1$ Mutanten, im Gegensatz zu den *azr1*^{S368Y} Mutanten, Gene aus 56 SMCs mehrheitlich unter Standardbedingungen ohne Fungizidanwendung, dass dereguliert, was sich unter anderen Kultivierungsbedingungen u. U. weiter erhöhen könnte. In den 1654 unter Standardbedingungen deregulierten Genen des $\Delta azr1$ Datensatzes gab es unter den insgesamt 69 vorhergesagten SMCs, 49 SMCs bei denen mindestens ein Gen dereguliert war. In einigen Fällen waren bis zu acht Gene betroffen. Dabei handelte es sich um Proteine mit katalytischer und transportierender Aktivität, sowie um Proteine mit Transkriptions-regulatorischer Aktivität. In einigen SMCs waren alle DEGs einheitlich herunterreguliert, in anderen SMCs wiederum alle DEGs hochreguliert und in einigen SMCs war ein Teil der Gene herunter- und ein Teil hochreguliert. Besonders viele Gene waren in den folgenden SMCs im Vergleich zum Wildtyp differentiell hochreguliert: C2, C13 (Aurofusarin), C31, C42 (Fusarin C), C59 (Culmorin), C61, C63 (Malonichrome). Einheitlich herunterreguliert waren die beiden SMCs C26 und C38. DEGs in C9 waren teils hoch teils herunterreguliert. Die Transkriptgehalte der SMC-Gene des Aurofusarin- und Fusarin C-SMCs von *azr1*^{S368Y} und $\Delta azr1$ Mutanten unterschieden sich unter Standardbedingungen und unter Fungizid-Stress voneinander. Insgesamt sind die Gene dieser beiden SMC in den $\Delta azr1$ Mutanten stärker hochreguliert als im Wildtyp und den *azr1*^{S368Y} Mutanten. Allgemein werden die Transkriptgehalte beider SMCs allerdings sowohl im Wildtyp wie auch in den *azr1*^{S368Y} und $\Delta azr1$ Mutanten als Antwort auf Fungizid-Stress herunterreguliert. Diese Daten zeigen, wie komplex und heterogen die durch *Azr1* hervorgerufene Reaktion ist.

Auf der Pflanze bildet *F. graminearum* spezialisierte unverzweigte Hyphen, sogenannte *runner hyphae* aus, von welchen multizelluläre Infektionsstrukturen, sogenannte Infektionskissen, gebildet werden. Mentges et al. (2020) verwendeten *Laser Capture Microdissection*, um die unverzweigten Hyphen und die Infektionskissen von der Weizenoberfläche zu isolieren. RNAseq Transkriptomanalysen an den beiden Infektionsstrukturen zeigten, dass bestimmte SMCs nur in bestimmten Infektionsstrukturen herunter- oder hochreguliert sind (Mentges et al. 2020). Vergleicht man diese SMC mit denen in dieser Arbeit gefundenen deregulierten SMCs, so zeigt sich eine gut 50 %ige Überschneidung. Weitere Studien zeigen in Pilzen, die mehrere Wirtspflanzenarten infizieren, dass einige pilzliche SMCs während der Infektion entsprechend den Umweltbedingungen transkriptionell hochreguliert werden und für die Etablierung einer erfolgreichen Infektion essenziell, zumindest aber von Vorteil sind (Arias et al. 2018; Dean et al. 2012). In *Botrytis cinerea* wurde gezeigt, dass *botcinic acid* und *botrydial* für die

nekrotrophe Lebensphase des Pilzes benötigt werden. Die Funktion zahlreicher weiterer Sekundärmetabolite ist hingegen in diesem Organismus, wie auch in den meisten anderen phytopathogenen Pilzen, weiterhin unbekannt (Fillinger and Elad 2016; Colmenares et al. 2002). Ein weiteres Beispiel für den engen Zusammenhang zwischen Virulenz und Sekundärmetabolitproduktion stellt das T-Toxin des Maispathogens *Cochliobolus heterostrophus* dar. Dieses bindet das Urf13 Protein und führt in der Konsequenz zur Entstehung von Poren in den pflanzlichen Mitochondrienmembranen, wodurch die Etablierung der Infektion dramatisch unterstützt wird (Möbius and Hertweck 2009; Wolpert et al. 2002). Melanin und Siderophore stellen diesbezüglich weitere Beispiele dar. Außerdem ist mittlerweile bekannt, dass zusätzlich zu den bekannten Sekundärmetaboliten weitere Sekundärmetabolite existieren, welche aus Verknüpfungen zwischen zwei Sekundärmetabolit-Biosynthesewegen hervorgehen (Wolpert et al. 2002). Zusammen zeigen diese Studien, dass einige Sekundärmetabolite in der Lage sind den Infektionsprozess positiv zu unterstützen und dies vielleicht der Grund dafür sein könnte, dass die $\Delta azr1$ Mutanten auf Mais leicht virulenter als das Wildtypisolat zu sein scheinen. Interessanterweise wurde zudem in *F. verticillioides* und *Alternaria brassicicola* gezeigt, dass pflanzliche Oligo- und Polysaccharide als Signale wiederum auch die Sekundärmetabolitproduktion beeinflussen können (Bluhm and Woloshuk 2005; Oka et al. 2005). Für einige der weiter oben gelisteten und im Rahmen dieser Arbeit relevanten SMC mit bekannten Sekundärmetaboliten, kann aufgrund bereits existierender experimenteller Datensätze ein Zusammenhang zwischen Sekundärmetabolit-Synthese und Virulenz allerdings ausgeschlossen werden (Zeilinger et al. 2015). Andererseits wurde für Malonichrome und die Trichothecene ein Zusammenhang mit der Virulenz bewiesen. Bei Malonichrome handelt es sich um eines von zwei extrazellulären Siderophoren, dessen Produktion in der Pflanze induziert wird. Bei dem Trichothecen DON handelt es sich um einen Virulenzfaktor, der zu Beginn der Infektion die Kolonisierung des Pflanzengewebes beeinflusst und ohne den *F. graminearum* Isolate sogar sensitiver gegenüber Azol-Fungiziden werden (Zeilinger et al. 2015; Mentges et al. 2020; Becher et al. 2011; Oide et al. 2015). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass, obwohl Aurofusarin in infizierten Weizenähren gefunden wurde, Aurofusarin keinen Einfluss auf die Virulenz zu haben scheint (Kotik and Trufanova 1998; Malz et al. 2005; Kim et al. 2005; Kim et al. 2006). Inwieweit die anderen deregulierten SMCs einen Einfluss auf die Virulenz haben, kann derzeit nicht beantwortet werden. Außerdem müssen jene SMC, welche in den $\Delta azr1$ Mutanten unter Standardbedingungen dereguliert sind, natürlich nicht zwangsweise auch *in planta* dereguliert sein. *In planta* Transkriptomanalysen der $\Delta azr1$ Mutanten könnten dies aufklären. Allerdings liegt die Vermutung nahe, dass die SMCs in den $\Delta azr1$ Mutanten nicht nur unter Standardbedingungen und unter Fungizid-Stress, sondern wahrscheinlich auch *in planta* dereguliert sein könnten. Unterstützt wird diese Hypothese durch die 50 %ige Überlappung mit

den SMC aus der bereits erwähnten *in planta* Transkriptom Studie in *F. graminearum* (Mentges et al. 2020).

Bei der Anzucht in Reismedium zeigte sich zudem, dass alle *AZR1*-Mutanten signifikant weniger Zearalenon dafür aber mehr Nivalenol (Trichothecen) produzierten. Diese Messungen zeigten, dass der Transkriptionsfaktor *Azr1* die Zearalenonproduktion positiv beeinflusst. Ein Testexperiment deutete in allen *AZR1*-Mutanten zudem erhöhte Aurofusaringehalte an (Daten nicht gezeigt). In diesem Zusammenhang muss auch erwähnt werden, dass reduzierte Aurofusarin- und Trichothecenen-Gehalte bekannterweise mit erhöhten Zearalenon-Gehalten einhergehen (Cambaza 2018). Die RNAseq und massenspektrometrischen Ergebnisse unterstützen diese Aussage. Höhere Aurofusarin-Gehalte könnten somit auch in den *AZR1*-Mutanten zu höheren Nivalenol- und niedrigeren Zearalenon-Gehalten führen. Dabei scheint dieser Effekt unabhängig davon zu sein, ob *Azr1* nicht gebildet wird, wie im Fall der $\Delta azr1$ Mutanten, oder ob *Azr1* vorhanden ist, aber den für die Azol Toleranz entscheidenden Aminosäureaustausch enthält. Da es sich bei DON und Nivalenol um Virulenzfaktoren handelt, könnte es sein, dass nicht nur wie bereits gezeigt, erhöhte DON-Gehalte, sondern auch erhöhte Nivalenol-Gehalte die Toleranz gegenüber Azol-Fungiziden positiv beeinflussen (Becher et al. 2011; Ilgen et al. 2008). Ein Effekt der u. U. von *Azr1* beeinflusst sein könnte.

Neben der Biosynthese von Mykotoxinen sind einige Pilze auch in der Lage sogenannte AFPs (*antifungal proteins*) bzw. AMPs (*antimicrobial proteins*) zu synthetisieren. Dabei handelt es sich um kleine bioaktive, zumeist kationische Proteine mit effektiver Wirkung u. a. gegen Mykotoxin produzierende Pilze. Pilzliche AMPs werden mit der Wachstumslimitierung konkurrierender Mikroorganismen in Verbindung gebracht und werden aus diesem Grund auch als potenzielle Quelle für die Entwicklung neuer Pflanzenschutzmittel thematisiert. So sind einige AMPs in der Lage die Synthese von β -Glucan oder Chitin zu inhibieren und wieder andere haben Mannoproteine als Target. Neben der Zerstörung von Zellwänden und Lipiden können AMPs allerdings auch die Synthese von Sekundärmetaboliten beeinflussen (Martínez-Culebras et al. 2021). Bei den Genen FGRAMPH1_01G16217 und FGRAMPH1_01G16215 könnte es sich um AMP-Vertreter handeln. Beide Proteine enthalten ein Signalpeptid, wobei nur für FGRAMPH1_01G16217 eine „antifungal“ Domäne vorhergesagt wurde. In den *azr1*^{S368Y} Mutanten wurde FGRAMPH1_01G16217 im Vergleich zum Wildtyp unter Fungizid-Stress stärker herunterreguliert. In den $\Delta azr1$ Mutanten wurden FGRAMPH1_01G16217 und FGRAMPH1_01G16215 dagegen unter Standardbedingungen und unter Fungizid-Stress deutlich stärker hochreguliert als im Wildtyp. Interessanterweise existieren für FGRAMPH1_01G16217 nur sieben orthologe Gene und zwar in *Aspergillus fischeri*, *Aspergillus niger*, *Beauveria bassiana*, *Colletotrichum orbiculare*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium pseudograminearum* und *Penicillium antarcticum*.

5.2.3 Der Aminosäureaustausch in Azr1 erhöht die Toleranz gegenüber Azol-Fungiziden

Im Vergleich zum Wildtyp ist das an Tebuconazol-adaptierte P1-11 Isolat deutlich toleranter gegenüber Azol-Fungiziden und unterscheidet sich durch das Vorhandensein mehrerer SNPs im Genom von diesem. Einer von diesen SNPs liegt innerhalb des Gens für den Transkriptionsfaktor *AZR1* und führt dort zu einem Einzelnukleotidaustausch. Um die Hypothese zu überprüfen, dass die Einführung dieses SNPs in den ORF des *AZR1*-Gens zu Azol Toleranz führt, wurden die in dieser Arbeit erzeugten Transformanten auf zwei verschiedene Arten hinsichtlich ihrer Toleranz gegenüber Fungiziden getestet. Dabei wurde zum einen die Fungizidtoleranz auf Petrischalen mit Fungizid haltigem Medium und zum anderen in Gegenwart von Fungiziden im Mikrotiterplattenformat analysiert. In beiden Testverfahren zeigte sich, dass die *azr1*^{S368Y} Mutanten und das P1-11 Isolat im Vergleich zum Wildtyp eine dreimal so hohe Konzentration an Tebuconazol und eine gut fünfmal so hohe Konzentration an Epoxiconazol tolerieren. Dies belegt, dass alleinig der SNP im *AZR1* Gen für den Azol-toleranten Phänotyp des P1-11 Isolates verantwortlich ist.

Interessanterweise wurde das vegetative Wachstum aller Mutanten in den Petrischalen mit Fungizid haltigem Medium durch die vier niedrigsten gewählten Azol-Konzentrationen in gleichem Maße wie das der Referenzstämme eingeschränkt. Da die Azol toleranten Isolate und das Wildtypisolat bis zu einer Konzentration von 2,5 µg/ml gleich stark inhibiert werden, unterscheiden sich die ED₅₀ Werte dieser Isolate nicht signifikant voneinander. Die ED₉₀ Werte zeigen hingegen, dass die effektiv benötigte Dosis für eine 90 %ige Wachstumshemmung der Azol-toleranten Isolate deutlich höher ist als die des Wildtypisolates. Ein vergleichbares Ergebnis zeigte sich unter Verwendung von Tebuconazol und Epoxiconazol auch in dem Mikrotiterplattentest, welcher Fungizidsensitivitätstests im Hochdurchsatz erlaubt. Bis auf Cyproconazol zeigten alle anderen getesteten Azol-Wirkstoffe einen stärkeren inhibitorischen Effekt auf den Wildtyp als auf die Azol toleranten *azr1*^{S368Y} Mutanten und das Isolat P1-11. Dabei zeigen Prothioconazol, Metconazol und Prochloraz im Vergleich zu Tebuconazol und Epoxiconazol bereits bei geringeren Konzentrationen ihre inhibitorische Wirkung. Fungizide Wirkstoffe mit anderen Resistenzmechanismen sind hingegen nicht einmal in der Lage, das Wildtypisolat zu inhibieren, was erneut die herausragende Stellung der Azol-Fungizide für die Bekämpfung von *Fusarium* unterstreicht. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl die *azr1*^{S368Y} Mutanten als auch das Isolat P1-11 eine signifikant erhöhte und spezifische Toleranz gegenüber mehreren Fungiziden mit gleichem Wirkungsmechanismus und ähnlicher chemischer Struktur haben und somit kreuzresistent sind.

Auch in anderen Transkriptionsfaktoren führten SNPs zu sogenannten „Gain Of Function“ (GOF)-Mutationen. Ein Beispiel dafür ist der Transkriptionsfaktor *UPC2* aus *C. glabrata*. Zwei bekannte SNPs innerhalb des ORF führen zu der Überexprimierung von *UPC2* selbst und erhöhen die Toleranz

gegenüber Azol-Fungiziden. Ursache dafür ist die Hochregulierung von Ergosterolbiosynthese- und Efflux-Transportergenen. Im Unterschied zu den Deletionsmutanten von *AZR1* sind die Δ *upc2*-Mutanten allerdings sensitiver gegenüber Azol-Fungiziden (Dunkel et al. 2008; Vu et al. 2021). Auch die Deletionsmutanten des Transkriptionsfaktors *Mrr1* in *B. cinerea* und *C. albicans* und die Deletionsmutanten des Transkriptionsfaktors *TAC1* aus *C. albicans* sind deutlich sensitiver gegenüber Azol-Fungiziden. Eine *GOF*-Mutation im Transkriptionsfaktor *Mrr1* führt allerdings ebenfalls zu einer Erhöhung der Azol Toleranz, in diesem Fall verursacht durch die Hochregulierung des mit Azol Toleranz assoziierten MFS-Transportergens *MDR1* (Morschhäuser et al. 2007; Kretschmer et al. 2009). Für den Transkriptionsfaktor *TAC1* sind sogar 16 verschiedene *GOF*-Mutationen bekannt, die mehrheitlich in der transkriptionsaktivierenden Domäne liegen. Für einige im Zusammenhang mit Azol Toleranz diskutierte Transkriptionsfaktoren wie z. B. *SlA*, *Mrr1* und *Tri6* wurde gezeigt, dass diese ihre eigene Transkription regulieren können (Du et al. 2021). Auch der Transkriptionsfaktor *Tac1* reguliert sowohl sich selbst. Außerdem reguliert er die Efflux-Transportergene *CDR1* und *CDR2* hoch. Ein Einfluss auf die Virulenz wurde, wie bei der *GOF*-Mutation in *AZR1*, nicht beobachtet (Coste et al. 2004; Coste et al. 2007). Auch in *C. glabrata* führt eine *GOF*-Mutation in dem Transkriptionsfaktorgen *PDR1* zu dessen eigener Hochregulierung, der Hochregulierung der beiden Efflux-Transportergene *CDR1* und *SNQ2* und der Hochregulierung von Genen, die in den Lipidmetabolismus und die Zellwandbiosynthese involviert sind (Tsai et al. 2006; Tsai et al. 2010; Torelli et al. 2008). Eine *GOF*-Mutation in dem Transkriptionsfaktorgen *XDR1* von *S. homoeocarpa* und *B. cinerea* vermittelt Resistenz gegenüber mehreren Fungizidklassen einschließlich Azol-Fungiziden. Neben Efflux-Transportern sind hier, vergleichbar zu der hier vorliegenden Arbeit, zudem P450 Monooxygenasen transkriptionell hochreguliert, von denen einige fungizide Wirkstoffe modifizieren können (Sang et al. 2018).

Mittels genomweiten RNAseq Experimenten wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Tebuconazol auf die Transkriptgehalte von Wildtyp, *azr1*^{S368Y} Mutanten und Δ *azr1* Mutanten analysiert. Dabei wurde sowohl im Wildtyp als auch in den Mutanten eine Deregulierung von Genen der Ergosterolbiosynthese beobachtet. Die Hochregulierung von Ergosterolbiosynthesen ist eine bekannte Reaktion auf die Antwort von Sterolbiosyntheseinhibitoren und wurde bereits in früheren Arbeiten beschrieben (Yang et al. 2015). Auch in den *azr1*^{S368Y} Mutanten könnten veränderte Transkriptgehalte der Ergosterolbiosynthesegene zu der beobachteten Azol Toleranz beitragen und selbst in den Δ *azr1* Mutanten könnten diese einen Einfluss auf die Reaktion gegenüber Azol-Fungiziden haben, obwohl die Δ *azr1* Mutanten genauso sensitiv gegenüber Azol-Fungiziden waren wie der Wildtyp. Um zu verstehen in welchem Maße die deregulierten Ergosterolbiosynthesegene einen Einfluss auf die Azol Toleranz der *azr1*^{S368Y} Mutanten haben könnten, müssen die transkriptionellen Unterschiede und Gemeinsamkeiten bzgl. der Ergosterolbiosynthesegene der *azr1*^{S368Y} Mutanten und der Δ *azr1*

Mutanten im Zusammenhang mit Fungizidanwendung betrachtet werden. Dabei waren die Transkriptgehalte von *ERG6b* und *ERG11/CYP51A* sowohl in den *azr1*^{S368Y} Mutanten als auch Δ *azr1* Mutanten die am stärksten hochregulierten Ergosterolbiosynthesegene. Dabei ist zu vermuten, dass besonders die im Vergleich zu den Δ *azr1* Mutanten noch höheren Transkriptgehalte von *ERG11/CYP51A*, dem Target der Azol-Fungizide, zu dem Azol toleranten Phänotyp der *azr1*^{S368Y} Mutanten positiv beitragen. Während dagegen die Transkriptgehalte von *ERG1*, *ERG2*, *ERG13* in den Δ *azr1* Mutanten hochreguliert waren, waren sie in den *azr1*^{S368Y} Mutanten im Vergleich zum Wildtyp herunterreguliert und erklären somit nicht den Azol toleranten Phänotyp. Obwohl die Transkriptgehalte von *ERG3b*, *ERG4*, *ERG5a*, *ERG6a*, *ERG7*, *ERG10a*, *ERG11/CYP51B*, *ERG24b* und *ERG27* ausschließlich in den Δ *azr1* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp hochreguliert waren und somit mehr Ergosterolbiosynthesegene in den Δ *azr1* Mutanten als in den *azr1*^{S368Y} hochreguliert zu sein schienen, zeigten die Δ *azr1* Mutanten jedoch im Gegensatz zu den *azr1*^{S368Y} Mutanten keine erhöhte Azol Toleranz. Dazu waren sowohl in den *azr1*^{S368Y} Mutanten als auch Δ *azr1* Mutanten die Transkriptgehalte des am Steroid-Transport beteiligten und mit Azol Toleranz bereits in Verbindung gebrachten ABC-Transporters *PDR5* im Vergleich zum Wildtyp hochreguliert. Die Hochregulierung von *PDR5* könnte demnach ebenso wie die von *ERG11/CYP51A* zu dem Azol toleranten Phänotyp der *azr1*^{S368Y} Mutanten beitragen. Im Fall der Δ *azr1* Mutanten könnte dagegen die Hochregulierung von *ERG27* und *ERG3b* ggf. einen negativen Effekt auf die Fungizidtoleranz hervorrufen, da Azol-Fungizide die Sterol 14- α demethylase inhibieren und Lanosterol somit durch die hochregulierten Gene *ERG27* und *ERG3b* vermehrt zu dem toxischen 14 α -methylergosta-8,24(28)-dien-3 β ,6 α -diol umgewandelt werden könnte. Der putativ positive Effekt der erhöhten Transkription von *ERG6b*, *ERG11/CYP51A* und *PDR5* könnte auf dies Weise nicht sichtbar werden. Insgesamt deutet die Deregulation von Ergosterolbiosynthesegenen darauf hin, dass *Azr1* direkt oder indirekt an der Regulation von Ergosterolbiosynthesegenen beteiligt zu sein scheint. Eine Beteiligung an der Regulation der Ergosterolbiosynthese konnte bereits u.a. für die Transkriptionsfaktoren *Upc2*, *Emc22*, *Skn7*, *AtrR* und *SltA* gezeigt werden (Vik and Rine 2001; MacPherson et al. 2005; Dunkel et al. 2008; Hagiwara et al. 2017; Wang et al. 2018; Du et al. 2021).

Wahrscheinlich wird die gegenüber dem Wildtyp signifikant erhöhte Azol Toleranz der *azr1*^{S368Y} Mutanten durch eine Kombination weiterer Faktoren hervorgerufen. Dabei waren in den *azr1*^{S368Y} Mutanten neben den erhöhten Transkriptgehalten des Efflux-Transporters *PDR5* die Transkriptgehalte weiterer Efflux-Transporter erhöht, welche putativ daran beteiligt sein könnten die Azol-Fungizidkonzentration in den Zellen zu reduzieren. Zu diesen könnten die hochregulierten MFS- bzw. ABC-Transporter *FGRAMPH1_01G15627*, *FGRAMPH1_01G05569* und *FGRAMPH1_01G05153* zählen. Ein vergleichbarer Effekt ist von Aminosäureaustauschen in den Transkriptionsfaktoren *Mrr1*, *Tac1*, *Pdr1* und *Xdr1* bekannt (Morschhäuser et al. 2007; Coste et al. 2004; Tsai et al. 2006; Vermitsky et al.

2006; Sang et al. 2018). Neben Efflux-Transportern können auch die Proteine von hochregulierten Cytochrom P450 Genen durch Modifikation von Azol-Fungiziden zur Azol Toleranz beitragen (Sang et al. 2018). In dieser Arbeit war das Cytochrom P450 Gen FGRAMPH1_01G03179 ausschließlich in den *azr1*^{S368Y} Mutanten unter Fungizid-Stress hochreguliert und könnte eventuell an der Detoxifizierung von Azol-Fungiziden beteiligt sein. Zudem haben die RNAseq-Experimente gezeigt, dass *AZR1* selbst als Reaktion auf Fungizid-Stress im Wildtyp und in einer der beiden unabhängigen *azr1*^{S368Y} Mutanten signifikant hochreguliert wurde und somit eine Funktion in der Antwort auf Azol-Fungizid-Stress hat. Interessant war in diesem Zusammenhang, dass auch das benachbarte Gen von *AZR1* (FGRAMPH1_01G12517) mit der ID FGRAMPH1_01G12519, als Reaktion auf Fungizid-Stress in den beiden *azr1*^{S368Y} Mutanten in stärkerem Maße als im Wildtyp hochreguliert war. Es handelt sich um ein Gen mit Oxidoreduktase-Domäne, welches ebenso wie *AZR1* besonders innerhalb der *Fusarium*-Arten konserviert ist. Es gibt weitere Faktoren, die u. U. einen Einfluss auf den Azol toleranten Phänotyp der *azr1*^{S368Y} Mutanten haben könnten. Dabei ist es schwer abzuschätzen, welchen Effekt die zahlreichen im Vergleich zum Wildtyp herunterregulierten Gene haben könnten. Zudem wurde unter Punkt 5.2.2 bereits darauf eingegangen, dass *AZR1* die Transkription von Sekundärmetabolit-Genen beeinflusst, von denen einige im Vergleich zum Wildtyp herunter- und andere hochreguliert waren. Zu den hochregulierten Genen zählten u. a. auch die beiden Transkriptionsfaktoren FGRAMPH1_01G00347 und FGRAMPH1_01G15629, welche ihrerseits weitere Gene regulieren. Nicht zuletzt ist es völlig unklar welchen Effekt bzw. welche Funktion die zahlreichen Proteine mit bislang unbekannter Funktion im Zusammenhang mit Azol Toleranz haben. Ein Beispiel dafür stellt FGRAMPH1_01G25277 dar, welches im Vergleich zum Wildtyp unter Fungizid-Stress in den *azr1*^{S368Y} Mutanten signifikant stärker heraufreguliert war und von dem lediglich bekannt ist, dass es über eine FAD/NAD(P)-bindende Domäne verfügt.

Bei der Entstehung von Azol Toleranz in Pilzen spielen Veränderungen in der transkriptionellen Regulation häufig eine Rolle (Becher et al. 2011; Paul and Moye-Rowley 2014). Die oben ausgeführten Ergebnisse lassen vermuten, dass auch in den *azr1*^{S368Y} Mutanten die Überexpression von Genen, vor allem die von Transportern und Enzymen mit z. B. Relevanz für die Ergosterolbiosynthese, den Grad der Azol Toleranz determiniert. Und auch die Transkription von *AZR1* selbst scheint für die Reaktion auf Fungizid-Stress von Bedeutung zu sein. Zusätzlich war in den *azr1*^{S368Y} Mutanten auch die Expression von einigen Genen mit Transkriptions-regulatorischer Aktivität verändert, welche ihrerseits wiederum die Transkriptgehalte weiterer Gene beeinflussen sollten. Dies könnte auf regulatorische Netzwerke mit Verknüpfungen untereinander hinweisen, die bei einer *azr1*^{S368Y} Mutation eine gegenüber dem Wildtyp erhöhte Azol-toleranz verursachen. Zudem zeigt die Aktivierung weiterer

Transkriptionsfaktoren, dass Azr1 direkt und indirekt Gene reguliert, was die hohe Komplexität an veränderten Transkriptgehalten erklärt.

Mit der Hilfe von Chromatin-Immunpräzipitations-Experimenten gekoppelt mit Sequenzierungsverfahren (ChIPseq) wäre es interessant, die direkten Bindestellen von Azr1 zu ermitteln (Nakato and Sakata 2021). Würde diese Methode darüber hinaus auch auf die anderen, möglicherweise durch Azr1 regulierten Transkriptionsfaktoren, angewendet, könnten solche Netzwerke und ihre hierarchischen Regulationsebenen identifiziert werden. Im Fall von Tac1, Mrr1 und Upc2 in *Candida* spp. konnte auf diese Weise gezeigt werden, dass obwohl jeder dieser Transkriptionsfaktoren ein eigenes Set an spezifischen Genen kontrolliert, regulatorische Verknüpfungen zwischen deren Zielgenen existieren (Sanglard et al. 2009). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt kann nicht abschließend beurteilt werden, ob es sich bei AZR1 um einen generellen Aktivator oder für bestimmte Gene um einen Repressor handelt, da die Transkriptgehalte einiger Gene hochreguliert und die anderer Gene wiederum herunterreguliert sind. Während im Falle eines Aktivators dessen Deletionsmutanten eine reduzierte Expression der Zielgene aufweisen würden, wären deren Transkriptgehalte im Falle eines Repressors erhöht. Möglicherweise sind die Transkriptgehalte zusätzlich davon abhängig, ob weitere regulierende Aktivatoren oder Repressoren, welche ebenfalls durch Azr1 reguliert werden, vorhanden sind. Auch existieren in der Literatur Beispiele dafür, dass einige Transkriptionsfaktoren sowohl als Aktivatoren als auch als Repressoren fungieren können (Znaidi et al. 2008; Branco et al. 2021; Stoldt et al. 1997; Ramón and Fonzi 2003; Baek et al. 2006; Tilburn et al. 1995; Espeso and Arst Jr 2000; Michielse et al. 2014; Pfannmüller et al. 2017). Wichtig ist in diesem Zusammenhang auch die Frage, warum der Aminosäureaustausch von Serin zu Tyrosin zu der beobachteten Azol Toleranz führt. Im Gegensatz zu Serin handelt es sich bei Tyrosin um eine aromatische Aminosäure, welche gegenüber Serin ein wesentlich größeres Van-der-Waals Volumen aufweist. Demzufolge nimmt Tyrosin an Position 368 im Protein deutlich mehr Platz in Anspruch als Serin, was sowohl zu Konformationsänderungen von Azr1 selbst als auch zu Veränderungen des Bindungsverhalten von Azr1 mit anderen, ebenfalls an der Transkription beteiligten Proteinen führen könnte. Neben einer veränderten Bindungsstärke könnte zudem die Phosphorylierung der Hydroxyl-Gruppe am Tyrosin die Aktivität von Azr1 verändern. Aus diesen Gründen könnte das mutierte Azr1 in veränderter Weise an die Bindestellen seiner Zielgene binden und möglicherweise zusätzlich an weitere Bindestellen anderer Gene binden. Auch ist nicht klar, ob Azr1 als Monomer fungiert oder wie von einigen Transkriptionsfaktoren bereits bekannt ist, als Homodimer oder -multimer aktiv ist. Denkbar wäre auch, dass die Oligomerisierung durch den SNP vielleicht behindert wird (Amoutzias et al. 2007; Amoutzias et al. 2008; John et al. 2021).

5.3 Feldisolate

Es wäre denkbar, dass der in dieser Arbeit in *Azr1* eingeführte Aminosäureaustausch sich auch unter Feldbedingungen entwickeln und ausbreiten könnte. Aus landwirtschaftlicher Sicht wäre das ein großes Problem, da die Punktmutation im *AZR1* Gen die Toleranz gegenüber Azol-Fungiziden stark erhöht, die Virulenz dagegen aber in den *azr1*^{S368Y} Mutanten bemerkenswerterweise nicht beeinträchtigt war und nach Fungizidanwendung sogar leicht erhöht war. Ebenfalls von großer Bedeutung ist dabei, dass die Vitalität der Mutanten nicht herabgesetzt war. Schwer abzuschätzen ist dagegen, welchen Effekt die veränderte Mykotoxinproduktion auf derartige Feldisolate haben könnte. Mit dem sogenannten CAPS Marker Test (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) ist es schnell und kostengünstig möglich Feldisolate auf das Vorhandensein dieses Aminosäureaustausches hin zu testen. Die auf der Entstehung einer zusätzlichen Restriktionsschnittstelle basierende Methode wurde zunächst mit den in dieser Arbeit verwendeten Isolaten und daran anschließend, an ausgewählten leicht bis moderat Azol toleranten Feldisolaten getestet. Vergleichbare Tests wurden in der Vergangenheit u. a. in *Blumeria graminis*, *Venturia inaequalis* und *Sclerotinia homoeocarpa* erfolgreich angewendet (Bäumler et al. 2003a; Bäumler et al. 2003b; Fontaine et al. 2009; Lee et al. 2021). In diesem Pilotversuch wurde unter den getesteten Feldisolaten keines entdeckt, dass die *azr1*^{S368Y} Mutation aufwies. Zukünftige, größer angelegten Reihenversuche sollten die Anzahl der Testisolate hinsichtlich ihrer Herkünfte und Fungizidtoleranzen stark ausweiten, um abschätzen zu können, inwieweit der hier untersuchte SNP für die Entstehung von quantitativer Azol Toleranz auch im Feld verantwortlich sein könnte.

6 Zusammenfassung

In dieser Dissertation wurde in dem Mykotoxin produzierenden Weizenpathogen *F. graminearum* erstmalig der Transkriptionsfaktor *Azr1* als ein ursächlicher Faktor der Resistenz gegenüber Azol-Fungiziden identifiziert. Azol-Fungizide sind für die Bekämpfung von *F. graminearum* sehr wichtig, jedoch zeugen zahlreiche Feldisolate mit einer reduzierten Sensitivität von der Gefahr einer zunehmenden Resistenzentwicklung. Die Erweiterung des Verständnisses über die Entstehung der Azol Resistenz in *F. graminearum* ist deshalb von großer Bedeutung. Das in Vorläuferarbeiten erzeugte Azol-tolerante und Genom-sequenzierte Laborisolat P-11 besitzt im Vergleich zum Azol-sensitiven Wildtypstamm NRRL 13383 mehrere Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs). Ziel dieser Dissertation war es herauszufinden, welche dieser SNPs Azol-Resistenz vermitteln und welche Mechanismen dieser Resistenz zugrunde liegen. Zu diesem Zweck wurden in dieser Arbeit transgene Stämme erzeugt und im Vergleich zu Referenzisolaten eingehend charakterisiert.

BLAST Analysen zeigten, dass der bislang in keiner Pilzart charakterisierte Zn₂Cys₆-Transkriptionsfaktor *Azr1* nur innerhalb der *Fusarium*-Arten hoch konserviert ist. Um die Entstehung der Azol Toleranz in P1-11 aufzuzeigen, wurde zum einen in NRRL 13383 der ORF von *AZR1* deletiert und zum anderen durch ein Allel ersetzt, welches den ursprünglich in P1-11 entdeckten SNP enthielt. Ferner wurde *AZR1* in P1-11 durch den *AZR1* ORF von NRRL 13383 ausgetauscht, um zu prüfen, ob die anderen SNPs in P1-11 möglicherweise einen Einfluss auf die Azol Toleranz haben könnten. Auf diese Weise wurde gezeigt, dass die beobachteten phänotypischen Veränderungen jeweils eindeutig dem Genotyp der Deletion bzw. der Punktmutation zugeordnet werden konnten.

Obwohl zuvor mehrere Studien von Transkriptionsfaktoren berichteten hatten, die Azol Toleranz vermitteln und deren Deletionsmutanten eine verminderte Vitalität aufwiesen, wurde dies weder in den Deletions- noch in den Punktmutanten von *Azr1* in verschiedenen Wachstums- und Sporulationsexperimenten beobachtet. Die Anwendung von drei unterschiedlichen Virulenztests zeigte, dass die *AZR1* Mutanten mindestens so virulent waren wie das Wildtypisolat, und dass der untersuchte SNP in *AZR1* auf Azol behandelten Weizenähren sogar eine leicht erhöhte Azol-Toleranz vermittelte. Tests zum Nachweis der Fungizid Toleranz zeigten, dass die Punktmutanten etwa dreimal so hohe Konzentrationen an Tebuconazol und fünfmal so hohe Konzentrationen an Epoxiconazol wie der Wildtyp ertrugen. Der Abgleich mit den Daten der anderen in dieser Arbeit erzeugten Mutanten bewies, dass nur der SNP in *AZR1* für den Azol toleranten Phänotyp des P1-11 Isolates verantwortlich ist. Fungizide mit anderen Resistenzmechanismen inhibierten selbst den Wildtypstamm nicht, was zeigte, dass der hier beschriebene SNP sehr spezifisch die Azol-Toleranz beeinflusst.

Um Hinweise auf die durch *Azr1* regulierten Gene zu erhalten, wurden RNAseq Experimente durchgeführt, in welchen der Einfluss von Tebuconazol auf die Transkriptgehalte von Wildtyp, *azr1*^{S368Y}

Mutanten und $\Delta azr1$ Mutanten analysiert wurde. Die erhaltenen RNAseq Daten zeigen, dass die Hochregulierung von Genen der Ergosterolbiosynthese und im besonderem die von *ERG6b* und *ERG11/CYP51A*, sowie die Hochregulierung von MFS- bzw. ABC-Transportern sehr wahrscheinlich zu der erhöhten Azol Toleranz der *azr1*^{S368Y} Mutanten beitrug. Zudem könnte auch die Detoxifizierung von Azol-Fungiziden durch hochregulierte Cytochrom P450 Gene zur Azol Toleranz beigetragen haben. Es ist zu vermuten, dass zusätzlich einige der zahlreichen Proteine mit bislang unbekannter Funktion im Zusammenhang mit der beobachteten Fungizid Toleranz stehen könnten. Darüber hinaus wurden veränderte Transkriptgehalte bei einigen Genen mit einer vermuteten Transkriptions-regulatorischen Aktivität entdeckt, welche ihrerseits wiederum die Transkriptgehalte weiterer Gene beeinflussen könnten, die die Azol Toleranz beeinflussen. Nicht zuletzt zeigten die RNAseq Experimente, dass *AZR1* einer Selbstregulation unterliegt.

Da der in dieser Dissertation für *Azr1* beschriebene Aminosäureaustausch in Laborversuchen zu keiner nachweisbaren Verminderung der Vitalität führte, wäre es möglich, dass wenn er unter Feldbedingungen entstehen würde, sich dann auch ausbreiten könnte, was zu Problemen im Anbau von Weizen führen würde und problematisch für die Mykotoxinbelastung des Erntegutes werden könnte. Daher könnten Reihenversuche mit Feldisolaten, mit dem in dieser Arbeit für *Azr1* entwickelten CAPS Marker Test durchgeführt werden. Hierdurch ließe sich abschätzen, inwieweit der hier untersuchte SNP für die Entstehung von quantitativer Azol Toleranz im Feld verantwortlich ist.

7 Literaturverzeichnis

- Abe F, Usui K, Hiraki T (2009) Fluconazole Modulates Membrane Rigidity, Heterogeneity, and Water Penetration into the Plasma Membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 48(36): 8494-8504. doi:10.1021/bi900578y
- Abou Ammar G, Tryono R, Doll K, Karlovsky P, Deising HB, Wirsal SGR (2013) Identification of ABC Transporter Genes of *Fusarium graminearum* with Roles in Azole Tolerance and/or Virulence. *PLoS One* 8(11): e79042. doi:10.1371/journal.pone.0079042
- Ahamed S, Foster JS, Bukovsky A, Wimalasena J (2001) Signal Transduction through the ras/Erk Pathway Is Essential for the Mycoestrogen Zearalenone-Induced Cell-Cycle Progression in MCF-7 Cells. *Molecular Carcinogenesis* 30(2): 88-98. doi:10.1002/1098-2744(200102)30:2<88::aid-mc1017>3.0.co;2-e
- Al-Fakih AA (2014) Overview on the Fungal Metabolites Involved in Mycopathology. *Open Journal of Medical Microbiology* 4: 38-63. doi:10.4236/ojmm.2014.41006
- Alarco A-M, Balan I, Talibi D, Mainville N, Raymond M (1997) AP1-Mediated Multidrug Resistance in *Saccharomyces cerevisiae* Requires FLR1 Encoding a Transporter of the Major Facilitator Superfamily. *Journal of Biological Chemistry* 272(31): 19304-19313. doi: 10.1074/jbc.272.31.19304
- Alexander NJ, McCormick SP, Waalwijk C, van der Lee T, Proctor RH (2011) The Genetic Basis for 3-ADON and 15-ADON Trichothecene Chemotypes in *Fusarium*. *Fungal Genetics and Biology* 48(5):485-495. doi:10.1016/j.fgb.2011.01.003
- Allen BL, Taatjes DJ (2015) The Mediator Complex: A Central Integrator of Transcription. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16(3): 155-166. doi: 10.1038/nrm3951
- Amoutzias G, Veron A, Weiner III J, Robinson-Rechavi M, Bornberg-Bauer E, Oliver S, Robertson D (2007) One Billion Years of bZIP Transcription Factor Evolution: Conservation and Change in Dimerization and DNA-Binding Site Specificity. *Molecular Biology and Evolution* 24(3): 827-835. doi: 10.1093/molbev/msl211
- Amoutzias GD, Robertson DL, Van de Peer Y, Oliver SG (2008) Choose Your Partners: Dimerization in Eukaryotic Transcription Factors. *Trends in Biochemical Sciences* 33 (5):220-229. doi: 10.1016/j.tibs.2008.02.002
- Anderson JB, Sirjusingh C, Parsons AB, Boone C, Wickens C, Cowen LE, Kohn LM (2003) Mode of Selection and Experimental Evolution of Antifungal Drug Resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 163(4): 1287-1298. doi: 10.1093/genetics/163.4.1287

- Andrade AC, Del Sorbo G, Van Nistelrooy JGM, De Waard MA (2000a) The ABC Transporter AtrB from *Aspergillus nidulans* Mediates Resistance to All Major Classes of Fungicides and Some Natural Toxic Compounds. *Microbiology* 146: 1987-1997. doi:10.1099/00221287-146-8-1987
- Andrade AC, Van Nistelrooy JG, Peery RB, Skatrud PL, De Waard MA (2000b) The Role of ABC Transporters from *Aspergillus nidulans* in Protection against Cytotoxic Agents and in Antibiotic Production. *Molecular and General Genetics* 263(6): 966-977. doi:10.1007/pl00008697
- Arias M, Santiago L, Vidal-García M, Redrado S, Lanuza P, Comas L, Domingo MP, Rezusta A, Gálvez EM (2018) Preparations for Invasion: Modulation of Host Lung Immunity During Pulmonary *Aspergillosis* by Gliotoxin and Other Fungal Secondary Metabolites. *Frontiers in Immunology* 9: 2549. doi:10.3389/fimmu.2018.02549
- Atanasoff D (1920) *Fusarium* Blight (Scab) of Wheat and Other Cereals. *Journal of Agricultural Research* 20: 1-32
- Atanasova L, Knox BP, Kubicek CP, Druzhinina IS, Baker SE (2013) The Polyketide Synthase Gene *pks4* of *Trichoderma reesei* Provides Pigmentation and Stress Resistance. *Eukaryotic Cell* 12(11): 1499-1508. doi:10.1128/EC.00103-13
- Babula P, Adam V, Havel L, Kizek R (2009) Noteworthy Secondary Metabolites Naphthoquinones - Their Occurrence, Pharmacological Properties and Analysis. *Current Pharmaceutical Analysis* 5(1): 47-68. doi:10.2174/157341209787314936
- Baek Y-U, Martin SJ, Davis DA (2006) Evidence for Novel pH-Dependent Regulation of *Candida albicans* Rim101, a Direct Transcriptional Repressor of the Cell Wall β -Glycosidase Phr2. *Eukaryotic Cell* 5(9): 1550-1559. doi:10.1128/EC.00088-06
- Bai G, Shaner G (2004) Management and Resistance in Wheat and Barley to *Fusarium* Head Blight. *Annual Reviews of Phytopathology* 42: 135-161. doi:10.1146/annurev.phyto.42.040803.140340
- Balding PR, Porro CS, McLean KJ, Sutcliffe MJ, Marechal JD, Munro AW, de Visser SP (2008) How Do Azoles Inhibit Cytochrome P450 Enzymes? A Density Functional Study. *Journal of Physical Chemistry A* 112(50): 12911-12918. doi:10.1021/jp802087w
- Bartels M (2000) Leitfaden Pflanzenschutz 2000 - Welche Fungizidstrategie Im Weizen 2000? *Top Agrar* 1: 51-57
- Bäumler S, Felsenstein F, Schwarz G (2003a) CAPS and DHPLC Analysis of a Single Nucleotide Polymorphism in the Cytochrome b Gene Conferring Resistance to Strobilurins in Field Isolates of *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Journal of Phytopathology* 151(3): 149-152. doi:10.1046/j.1439-0434.2003.00699.x

- Bäumler S, Sierotzki H, Gisi U, Mohler V, Felsenstein FG, Schwarz G (2003b) Evaluation of *Erysiphe graminis* f sp *tritici* Field Isolates for Resistance to Strobilurin Fungicides with Different SNP Detection Systems. *Pest Management Science* 59(3): 310-314. doi:10.1002/ps.639
- Becher R, Hettwer U, Karlovsky P, Deising HB, Wirsal SG (2010) Adaptation of *Fusarium graminearum* to Tebuconazole Yielded Descendants Diverging for Levels of Fitness, Fungicide Resistance, Virulence, and Mycotoxin Production. *Phytopathology* 100(5): 444-453. doi:10.1094/PHYTO-100-5-0444
- Becher R, Miedaner, T. and Wirsal, S.G.R. (2013) Biology, Diversity and Management of FHB-Causing *Fusarium* Species in Small-Grain Cereals in Agricultural Applications The Mycota. Berlin: Springer Berlin Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-36821-9_8
- Becher R, Weihmann F, Deising HB, Wirsal SG (2011) Development of a Novel Multiplex DNA Microarray for *Fusarium graminearum* and Analysis of Azole Fungicide Responses. *BMC Genomics* 12: 52. doi:10.1186/1471-2164-12-52
- Becher R, Wirsal SG (2012) Fungal Cytochrome P450 Sterol 14 α -Demethylase (CYP51) and Azole Resistance in Plant and Human Pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology* 95(4): 825-840. doi:10.1007/s00253-012-4195-9
- Bellamine A, Lepesheva GI, Waterman MR (2004) Fluconazole Binding and Sterol Demethylation in Three CYP51 Isoforms Indicate Differences in Active Site Topology. *Journal of Lipid Research* 45(11): 2000-2007. doi:10.1194/jlr.M400239-JLR200
- Bennett JW, Klich M (2003) Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16(3): 497-516. doi:10.1128/Cmr.16.3.497-516.2003
- Beyer M, Klix MB, Klink H, Verreet JA (2006) Quantifying the Effects of Previous Crop, Tillage, Cultivar and Triazole Fungicides on the Deoxynivalenol Content of Wheat Grain - a Review. *Journal of Plant Diseases and Protection* 113(6): 241-246. doi:10.1007/Bf03356188
- Blandino M, Haidukowski M, Pascale M, Plizzari L, Scudellari D, Reyneri A (2012) Integrated Strategies for the Control of *Fusarium* Head Blight and Deoxynivalenol Contamination in Winter Wheat. *Field Crops Research* 133: 139-149. doi:10.1016/j.fcr.2012.04.004
- Blandino M, Pilati A, Reyneri A, Scudellari D (2010) Effect of Maize Crop Residue Density on *Fusarium* Head Blight and on Deoxynivalenol Contamination of Common Wheat Grains. *Cereal Research Communications* 38(4): 550-559. doi:10.1556/Crc.38.2010.4.12
- Bluhm B, Woloshuk C (2005) Amylopectin Induces Fumonisin B1 Production by *Fusarium verticillioides* During Colonization of Maize Kernels. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18(12): 1333-1339. doi: 10.1094/MPMI-18-1333
- Boenisch MJ, Schafer W (2011) *Fusarium graminearum* Forms Mycotoxin Producing Infection Structures on Wheat. *BMC Plant Biology* 11: 110. doi:10.1186/1471-2229-11-110

- Bouige P, Laurent D, Piloyan L, Dassa E (2002) Phylogenetic and Functional Classification of ATP-Binding Cassette (ABC) Systems. *Current Protein & Peptide Science* 3(5): 541-559. doi:10.2174/1389203023380486
- Boyacioglu D, Hettiarachchy NS (1995) Changes in Some Biochemical-Components of Wheat-Grain That Was Infected with *Fusarium-graminearum*. *Journal of Cereal Science* 21(1): 57-62. doi:10.1016/S0733-5210(95)80008-5
- Börner H (2009) *Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 8th edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Branco J, Martins-Cruz C, Rodrigues L, Silva RM, Araújo-Gomes N, Gonçalves T, Miranda IM, Rodrigues AG (2021) The Transcription Factor Ndt80 Is a Repressor of *Candida parapsilosis* Virulence Attributes. *Virulence* 12(1) :601-614. doi: 10.1080/21505594.2021.1878743
- Bridges AA, Gladfelter AS (2014) Fungal Pathogens are Platforms for Discovering Novel and Conserved Septin Properties. *Current Opinion in Microbiology* 20: 42-48. doi:10.1016/j.mib.2014.04.004
- Brown DW, Butchko RAE, Busman M, Proctor RH (2012a) Identification of Gene Clusters Associated with Fusaric Acid, Fusarin, and Perithecial Pigment Production in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics and Biology* 49(7): 521-532. doi:10.1016/j.fgb.2012.05.010
- Brown DW, Yu JH, Kelkar HS, Fernandes M, Nesbitt TC, Keller NP, Adams TH, Leonard TJ (1996) Twenty-Five Coregulated Transcripts Define a Sterigmatocystin Gene Cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 1418-1422. doi:10.1073/pnas.93.4.1418
- Brown NA, Antoniw J, Hammond-Kosack KE (2012b) The Predicted Secretome of the Plant Pathogenic Fungus *Fusarium graminearum*: a Refined Comparative Analysis. *PLoS One* 7(4): e33731. doi:10.1371/journal.pone.0033731
- Brown NA, Evans J, Mead A, Hammond-Kosack KE (2017) A Spatial Temporal Analysis of the *Fusarium graminearum* Transcriptome During Symptomless and Symptomatic Wheat Infection. *Molecular Plant Pathology* 18(9): 1295-1312. doi:10.1111/mpp.12564
- Buechel K, Gold H, Frohberger P, Kaspers H (1975) Triphenyl-1, 2, 3-Triazolyl-(1')-Methane, Verfahren Zu Ihrer Herstellung Und Ihre Verwendung Als Fungizide. *Chemical Abstracts* 83: Ger. Pat 2407305
- Bundesverband Agrarhandel E.V. (2017) *Wie Moderner Pflanzenschutz Unsere Ernährung Sichert*. <https://bv-agrar.de/standpunkte/wie-moderner-pflanzenschutz-unsere-ern%C3%A4hrung-sichert>
- Bushnell WR, Hazen BE, Pritsch C (2003) *Histology and Physiology of Fusarium Head Blight*. APS Press, St. Paul: 44-83

- Cambaza E (2018) Comprehensive Description of *Fusarium graminearum* Pigments and Related Compounds. *Foods* 7(10): 165. doi:10.3390/foods7100165
- Carter HE, Fraaije BA, West JS, Kelly SL, Mehl A, Shaw MW, Cools HJ (2014) Alterations in the Predicted Regulatory and Coding Regions of the Sterol 14 α -Demethylase Gene (CYP51) Confer Decreased Azole Sensitivity in the Oilseed Rape Pathogen *Pyrenopeziza brassicae*. *Molecular Plant Pathology* 15(5): 513-522. doi:10.1111/mpp.12106
- Carter JP, Rezanoor HN, Holden D, Desjardins AE, Plattner RD, Nicholson P (2002) Variation in Pathogenicity Associated with the Genetic Diversity of *Fusarium graminearum*. *European Journal of Plant Pathology* 108(6): 573-583. doi:10.1023/A:1019921203161
- Cary JW, Ehrlich KC (2006) Aflatoxigenicity in *Aspergillus*: Molecular Genetics, Phylogenetic Relationships and Evolutionary Implications. *Mycopathologia* 162(3): 167-177. doi:10.1007/s11046-006-0051-8
- Champeil A, Fourbet JF, Dore T, Rossignol L (2004) Influence of Cropping System on *Fusarium* Head Blight and Mycotoxin Levels in Winter Wheat. *Crop Protection* 23(6): 531-537. doi:10.1016/j.cropro.2003.10.011
- Chandelier A, Nimal C, Andre F, Planchon V, Oger R (2011) *Fusarium* Species and DON Contamination Associated with Head Blight in Winter Wheat over a 7-Year Period (2003-2009) in Belgium. *European Journal of Plant Pathology* 130(3): 403-414. doi:10.1007/s10658-011-9762-x
- Chau AS, Gurnani M, Hawkinson R, Laverdiere M, Cacciapuoti A, McNicholas PM (2005) Inactivation of Sterol $\Delta^{5,6}$ -Desaturase Attenuates Virulence in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(9): 3646-3651. doi:10.1128/AAC.49.9.3646-3651.2005
- Chen C-G, Yang Y-L, Shih H-I, Su C-L, Lo H-J (2004) CaNdt80 Is Involved in Drug Resistance in *Candida albicans* by Regulating CDR1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(12): 4505-4512. doi:10.1128/AAC.48.12.4505-4512.2004
- Chen C-G, Yang Y-L, Tseng K-Y, Shih H-I, Liou C-H, Lin C-C, Lo H-J (2009) Rep1p Negatively Regulating MDR1 Efflux Pump Involved in Drug Resistance in *Candida albicans*. *Fungal Genetics and Biology* 46(9): 714-720. doi:10.1016/j.fgb.2009.06.003
- Chen H, Wu Q, Zhang G, Wu J, Zhu F, Yang H, Zhuang Y (2019) Carbendazim-Resistance of *Gibberella zeae* Associated with *Fusarium* Head Blight and Its Management in Jiangsu Province, China. *Crop Protection* 124:104866. doi:10.1094/PDIS-02-19-0391-RE
- Chen J, Wei J, Fu L, Wang S, Liu J, Guo Q, Jiang J, Tian Y, Che Z, Chen G (2021) Tebuconazole Resistance of *Fusarium graminearum* Field Populations from Wheat in Henan Province. *Journal of Phytopathology* 169(9): 525-532. doi:10.1111/jph.13021

- Chen Y, Zhou MG (2009) Characterization of *Fusarium graminearum* Isolates Resistant to Both Carbendazim and a New Fungicide JS399-19. *Phytopathology* 99(4): 441-446. doi:10.1094/Phyto-99-4-0441
- Coleman JJ, Mylonakis E (2009) Efflux in Fungi: la Piece de Resistance. *PloS Pathogens* 5(6): e1000486. doi:10.1371/journal.ppat.1000486
- Collemare J, Pianfetti M, Houille AE, Morin D, Camborde L, Gagey MJ, Barbisan C, Fudal I, Lebrun MH, Bohnert HU (2008) *Magnaporthe grisea* Avirulence Gene ACE1 Belongs to an Infection-Specific Gene Cluster Involved in Secondary Metabolism. *New Phytologist* 179(1): 196-208. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02459.x
- Colmenares A, Aleu J, Duran-Patron R, Collado I, Hernandez-Galan R (2002) The Putative Role of Botrydial and Related Metabolites in the Infection Mechanism of *Botrytis cinerea*. *Journal of Chemical Ecology* 28(5): 997-1005. doi:10.1023/a:1015209817830
- Cools HJ, Hawkins NJ, Fraaije BA (2013) Constraints on the Evolution of Azole Resistance in Plant Pathogenic Fungi. *Plant Pathology* 62(S1): 36-42. doi:10.1111/ppa.12128
- Cools HJ, Mullins JGL, Fraaije BA, Parker JE, Kelly DE, Lucas JA, Kelly SL (2011) Impact of Recently Emerged Sterol 14 α -Demethylase (CYP51) Variants of *Mycosphaerella graminicola* on Azole Fungicide Sensitivity. *Applied and Environmental Microbiology* 77(11): 3830-3837. doi:10.1128/AEM.00027-11
- Coste A, Selmecki A, Forche A, Diogo D, Bougnoux ME, d'Enfert C, Berman J, Sanglard D (2007) Genotypic Evolution of Azole Resistance Mechanisms in Sequential *Candida albicans* Isolates. *Eukaryotic Cell* 6(10): 1889-1904. doi:10.1128/EC.00151-07
- Coste AT, Karababa M, Ischer F, Bille J, Sanglard D (2004) TAC1, Transcriptional Activator of CDR Genes, Is a New Transcription Factor Involved in the Regulation of *Candida albicans* ABC Transporters CDR1 and CDR2. *Eukaryotic Cell* 3(6): 1639-1652. doi:10.1128/ec.3.6.1639-1652.2004
- Cowen LE, Steinbach WJ (2008) Stress, Drugs, and Evolution: The Role of Cellular Signaling in Fungal Drug Resistance. *Eukaryotic Cell* 7(5): 747-764. doi:10.1128/EC.00041-08
- Cowger C, Sutton AL (2005) The Southeastern U.S. *Fusarium* Head Blight Epidemic of 2003. *Plant Health Progress* 6: 1. doi:10.1094/PHP-2005-1026-01-RS
- de Waard MA, Andrade AC, Hayashi K, Schoonbeek HJ, Stergiopoulos I, Zwiers LH (2006) Impact of Fungal Drug Transporters on Fungicide Sensitivity, Multidrug Resistance and Virulence. *Pest Management Science* 62(3): 195-207. doi:10.1002/ps.1150
- Dean R, Van Kan JA, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J, Foster GD (2012) The Top 10 Fungal Pathogens in Molecular Plant Pathology. *Molecular Plant Pathology* 13(4): 414-430. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x

- Deising HB, Amorim R, De Oliveira Silva A, Raschke A, Eisermann I, Wirsel SGR, Csuk R, Schmitz LM, N. A Antagonistic Microorganisms in Plant Protection: Consumers' Friends or Foes? In: 19th International Reinhardsbrunn Symposium, Friedrichroda, 2019. Modern Fungicides and Antifungal Compounds IX.
- Deising HB, Reimann S, Pascholati SF (2008) Mechanisms and Significance of Fungicide Resistance. *Brazilian Journal of Microbiology* 39(2): 286-295. doi:10.1590/S1517-838220080002000017
- Del Sorbo G, Andrade AC, Van Nistelrooy JG, Van Kan JA, Balzi E, De Waard MA (1997) Multidrug Resistance in *Aspergillus nidulans* Involves Novel ATP-Binding Cassette Transporters. *Molecular and General Genetics* 254(4): 417-426. doi:10.1007/s004380050434
- Del Sorbo G, Schoonbeek HJ, De Waard MA (2000) Fungal Transporters Involved in Efflux of Natural Toxic Compounds and Fungicides. *Fungal Genetics and Biology* 30(1): 1-15. doi:10.1006/fgbi.2000.1206
- Desjardins AE, Proctor RH (2007) Molecular Biology of *Fusarium* Mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology* 119(1-2): 47-50. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.024
- Desjardins AE, Proctor RH (2011) Genetic Diversity and Trichothecene Chemotypes of the *Fusarium graminearum* Clade Isolated from Maize in Nepal and Identification of a Putative New Lineage. *Fungal Biology* 115(1): 38-48. doi:10.1016/j.funbio.2010.10.002
- Desmond OJ, Manners JM, Stephens AE, Maclean DJ, Schenk PM, Gardiner DM, Munn AL, Kazan K (2008) The *Fusarium* Mycotoxin Deoxynivalenol Elicits Hydrogen Peroxide Production, Programmed Cell Death and Defence Responses in Wheat. *Molecular Plant Pathology* 9(4): 435-445. doi:10.1111/j.1364-3703.2008.00475.x
- Dhodary B, Schilg M, Wirth R, Spiteller D (2018) Secondary Metabolites from *Escovopsis weberi* and Their Role in Attacking the Garden Fungus of Leaf-Cutting Ants. *Chemistry—A European Journal* 24(17): 4445-4452
- Diekman MA, Green ML (1992) Mycotoxins and Reproduction in Domestic Livestock. *Journal of Animal Science* 70(5): 1615-1627. doi:10.2527/1992.7051615x
- Dietrichs WB, T.; Knott, J.; Klink, H.; Verreet, J. A. (2012) Anbau Von Energiepflanzen Erfordert Neue Konzepte Im Pflanzenschutz - Mykotoxinbelastung in Silomais Und Getreide Nimmt Zu. *Bauernblatt*
- Dill-Macky R (2008) Cultural Control Practices for *Fusarium* Head Blight: Problems and Solutions. *Cereal Research Communications* 36:653-657. doi:10.1556/CRC.36.2008.Suppl.B.55
- Dill-Macky R, Jones RK (2000) The Effect of Previous Crop Residues and Tillage on *Fusarium* Head Blight of Wheat. *Plant Disease* 84(1): 71-76. doi:10.1094/Pdis.2000.84.1.71
- Dixon RA (2001) Natural Products and Plant Disease Resistance. *Nature* 411 (6839):843-847. doi:10.1038/35081178

- do Nascimento AM, Goldman MH, Goldman GH (2002) Molecular Characterization of ABC Transporter-Encoding Genes in *Aspergillus nidulans*. *Genetics and Molecular Research* 1(4): 337-349
- Doohan FM, Brennan J, Cooke BM (2003) Influence of Climatic Factors on *Fusarium* Species Pathogenic to Cereals. *European Journal of Plant Pathology* 109(7): 755-768. doi:10.1023/A:1026090626994
- Došen I, Andersen B, Phippen CB, Clausen G, Nielsen KF (2016) *Stachybotrys* Mycotoxins: From Culture Extracts to Dust Samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408(20): 5513-5526. doi:10.1007/s00216-016-9649-y
- Du W, Zhai P, Wang T, Bromley MJ, Zhang Y, Lu L (2021) The C2H2 Transcription Factor SlrA Contributes to Azole Resistance by Coregulating the Expression of the Drug Target Erg11A and the Drug Efflux Pump Mdr1 in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 65(4): e01839-01820. doi:10.1128/AAC.01839-20
- Dubin HJ, Ruckebauer P (1997) Foreword. In: *Fusarium Head Scab: Global Status and Future Prospects*. CIMMYT, El Batán, Mexico, pp V
- Dubos T, Pasquali M, Pogoda F, Hoffmann L, Beyer M (2011) Evidence for Natural Resistance Towards Trifloxystrobin in *Fusarium graminearum*. *European Journal of Plant Pathology* 130(2): 239-248. doi:10.1007/s10658-011-9749-7
- Dunkel N, Liu TT, Barker KS, Homayouni R, Morschhauser J, Rogers PD (2008) A Gain-of-Function Mutation in the Transcription Factor Upc2p Causes Upregulation of Ergosterol Biosynthesis Genes and Increased Fluconazole Resistance in a Clinical *Candida albicans* Isolate. *Eukaryotic Cell* 7(7): 1180-1190. doi:10.1128/EC.00103-08
- Dvorska JE, Surai PF, Speake BK, Sparks NH (2001) Effect of the Mycotoxin Aurofusarin on the Antioxidant Composition and Fatty Acid Profile of Quail Eggs. *British Poultry Science* 42(5): 643-649. doi:10.1080/00071660120088470
- Dvorska JE, Surai PF, Speake BK, Sparks NH (2002) Antioxidant Systems of the Developing Quail Embryo Are Compromised by Mycotoxin Aurofusarin. *Comparative Biochemistry Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 131(2): 197-205. doi:10.1016/s1532-0456(02)00006-6
- Edwards SG, Godley NP (2010) Reduction of *Fusarium* Head Blight and Deoxynivalenol in Wheat with Early Fungicide Applications of Prothioconazole. *Food Additives and Contaminants Part A: Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* 27(5): 629-635. doi:10.1080/19440040903515942
- Eiblmeier P, von Gleissenthall JL (2007) Risk Evaluation of Deoxynivalenol Levels in Bavarian Wheat from Survey Data. *Journal of Plant Diseases and Protection* 114(2): 69-75. doi:10.1007/Bf03356206

- Enjalbert B, Nantel A, Whiteway M (2003) Stress-Induced Gene Expression in *Candida albicans*: Absence of a General Stress Response. *Molecular Biology of the Cell* 14(4): 1460-1467. doi:10.1091/mbc.E02-08-0546
- Eskola M, Kos G, Elliott CT, Hajslova J, Mayar S, Krska R (2020) Worldwide Contamination of Food-Crops with Mycotoxins: Validity of the Widely Cited 'FAO Estimate' of 25. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 60(16): 2773-2789. doi:10.1080/10408398.2019.1658570
- Espeso EA, Arst Jr HN (2000) On the Mechanism by Which Alkaline pH Prevents Expression of an Acid-Expressed Gene. *Molecular and Cellular Biology* 20(10): 3355-3363. doi:10.1128/mcb.20.10.3355-3363.2000
- Evenson RE, Gollin D (2003) Assessing the Impact of the Green Revolution, 1960 to 2000. *Science* 300(5620): 758-762. doi:10.1126/science.1078710
- Fan GL, Zheng HW, Zhang K, Ganeshan VD, Opiyo SO, Liu D, Li MY, Li GP, Mitchell TK, Yun YZ, Wang ZH, Lu GD (2020) FgHtf1 Regulates Global Gene Expression Towards Aerial Mycelium and Conidiophore Formation in the Cereal Fungal Pathogen *Fusarium graminearum*. *Applied and Environmental Microbiology* 86(9): e03024-19. doi:10.1128/AEM.03024-19
- FAO (2018) *The Future of Food and Agriculture 2018 - Alternative Pathways to 2050*. Rome
- FAO (2021) *The State of Food and Agriculture 2021. Making Agrifood Systems More Resilient to Shocks and Stresses*. Rome
- Fehrmann H, Ahrens W, (1984) Attack of Wheat by *Septoria nodorum* and *Fusarium* Ear Blight II. Spray Application of Curatively Active Fungicides. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 91: 42-58
- Feinberg B, McLaughlin CS (1989) Biochemical Mechanism of Action of Trichothecene Mycotoxins. In: *Trichothecene Mycotoxicosis Pathophysiologic Effects*, vol I. CRC Press
- Fillinger S, Elad Y (2016) *Botrytis*-the Fungus, the Pathogen and Its Management in Agricultural Systems. Springer Cham. doi:10.1007/978-3-319-23371-0
- Fontaine S, Remuson F, Fraissinet-Tachet L, Micoud A, Marmeisse R, Melayah D (2009) Monitoring of *Venturia inaequalis* Harboring the QoI Resistance G143A Mutation in French Orchards as Revealed by PCR Assays. *Pest Management Science* 65(1): 74-81
- Foroud NA, Eudes F (2009) Trichothecenes in Cereal Grains. *International Journal of Molecular Sciences* 10(1): 147-173. doi:10.3390/ijms10010147
- Frandsen RJN, Nielsen NJ, Maolanon N, Sorensen JC, 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(4): 1069-1080. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05295.x

- Funk CK, B. (2016) The New Food Fights: U.S. Public Divides over Food Science. Pew Research Center. <https://www.pewresearch.org/science/2016/12/01/the-new-food-fights/>
- Gaffoor I, Brown DW, Plattner R, Proctor RH, Qi W, Trail F (2005) Functional Analysis of the Polyketide Synthase Genes in the Filamentous Fungus *Gibberella zeae* (Anamorph *Fusarium graminearum*). Eukaryotic Cell 4(11): 1926-1933. doi:10.1128/EC.4.11.1926-1933.2005
- Gale LR, Chen LF, Hernick CA, Takamura K, Kistler HC (2002) Population Analysis of *Fusarium graminearum* from Wheat Fields in Eastern China. Phytopathology 92(12): 1315-1322. doi:10.1094/PHYTO.2002.92.12.1315
- Gale LR, Harrison SA, Ward TJ, O'Donnell K, Milus EA, Gale SW, Kistler HC (2011) Nivalenol-Type Populations of *Fusarium graminearum* and *F. asiaticum* Are Prevalent on Wheat in Southern Louisiana. Phytopathology 101(1): 124-134. doi:10.1094/PHYTO-03-10-0067
- Gale LR, Ward TJ, Balmas V, Kistler HC (2007) Population Subdivision of *Fusarium graminearum* Sensu Stricto in the Upper Midwestern United States. Phytopathology 97(11): 1434-1439. doi:10.1094/PHYTO-97-11-1434
- Gardiner DM, Stephens AE, Munn AL, Manners JM (2013) An ABC Pleiotropic Drug Resistance Transporter of *Fusarium graminearum* with a Role in Crown and Root Diseases of Wheat. FEMS Microbiology Letters 348(1): 36-45. doi:10.1111/1574-6968.12240
- Ghosoph JM, Schmidt LS, Margosan DA, Smilanick JL (2007) Imazalil Resistance Linked to a Unique Insertion Sequence in the PdCYP51 Promoter Region of *Penicillium digitatum*. Postharvest Biology and Technology 44(1): 9-18. doi:10.1016/j.postharvbio.2006.11.008
- Gilbert J, Tekauz A (2000) Review: Recent Developments in Research on *Fusarium* Head Blight of Wheat in Canada. Canadian Journal of Plant Pathology 22(1): 1-8. doi:10.1080/07060660009501155
- Goffeau A (2008) Drug Resistance: The Fight against Fungi. Nature 452(7187): 541-542. doi:10.1038/452541a
- Goswami RS, Kistler HC (2004) Heading for Disaster: *Fusarium graminearum* on Cereal Crops. Molecular Plant Pathology 5(6): 515-525. doi:10.1111/j.1364-3703.2004.00252.x
- Guo XW, Fernando WGD, Seow-Brock HY (2008) Population Structure, Chemotype Diversity, and Potential Chemotype Shifting of *Fusarium graminearum* in Wheat Fields of Manitoba. Plant Disease 92(5): 756-762. doi:10.1094/PDIS-92-5-0756
- Gupta A, Chattoo BB (2008) Functional Analysis of a Novel ABC Transporter ABC4 from *Magnaporthe grisea*. FEMS Microbiology Letters 278(1): 22-28. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00937.x
- Hagiwara D, Miura D, Shimizu K, Paul S, Ohba A, Gono T, Watanabe A, Kamei K, Shintani T, Moyer-Rowley WS (2017) A Novel Zn₂-Cys₆ Transcription Factor AtrR Plays a Key Role in an Azole Resistance Mechanism of *Aspergillus fumigatus* by Co-Regulating *cyp51A* and *cdr1B* Expressions. PloS Pathogens 13(1): e1006096. doi:10.1371/journal.ppat.1006096

- Hammerschmidt R (1999) Phytoalexins: What Have We Learned after 60 Years? Annual Review of Phytopathology 37: 285-306. doi:10.1146/annurev.phyto.37.1.285
- Hao C, Yang Y, Du J, Deng XW, Li L (2022) The PCY-SAG14 Phytocyanin Module Regulated by PIFs and miR408 Promotes Dark-Induced Leaf Senescence in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 119(3): e2116623119. doi:10.1073/pnas.2116623119
- Harris A, Wagner M, Du D, Raschka S, Nentwig L-M, Gohlke H, Smits SH, Luisi BF, Schmitt L (2021) Structure and Efflux Mechanism of the Yeast Pleiotropic Drug Resistance Transporter Pdr5. Nature Communications 12(1): 1-14. doi:10.1038/s41467-021-25574-8.
- Hayashi K, Schoonbeek HJ, De Waard MA (2003) Modulators of Membrane Drug Transporters Potentiate the Activity of the DMI Fungicide Oxpoconazole against *Botrytis cinerea*. Pest Management Science 59(3): 294-302. doi:10.1002/ps.637
- Hewitt HG (1998) Fungicides in Crop Protection. In: CAB International. p 221
- Holland IB, Blight MA (1999) ABC-ATPases, Adaptable Energy Generators Fuelling Transmembrane Movement of a Variety of Molecules in Organisms from Bacteria to Humans. Journal of Molecular Biology 293(2): 381-399. doi:10.1006/jmbi.1999.2993
- Hollomon DW (1993) Resistance to Azole Fungicides in the Field. Biochemical Society Transactions 21(4): 1047-1051. doi:10.1042/bst0211047
- Holmes AR, Keniya MV, Ivnitski-Steele I, Monk BC, Lamping E, Sklar LA, Cannon RD (2012) The Monoamine Oxidase a Inhibitor Clorgyline Is a Broad-Spectrum Inhibitor of Fungal ABC and MFS Transporter Efflux Pump Activities Which Reverses the Azole Resistance of *Candida albicans* and *Candida glabrata* Clinical Isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 56(3): 1508-1515. doi:10.1128/Aac.05706-11
- Ilgen P, Maier F, Schäfer W (2008) Trichothecenes and Lipases Are Host-Induced and Secreted Virulence Factors of *Fusarium graminearum*. Cereal Research Communications 36(Supplement-6): 421-428. doi:10.1556/crc.36.2008.suppl.b.35
- Jackson MA, Freer SN (1991) The Influence of Carbon and Nitrogen Nutrition on Fusarin C Biosynthesis by *Fusarium moniliforme*. FEMS Microbiology Letters 66(3): 323-328. doi:10.1016/0378-1097(91)90282-f
- Jackson MA, Lanser AC (1993) Glucose and Zinc Concentration Influence Fusarin C Synthesis, Ethanol Synthesis and Lipid Composition in *Fusarium moniliforme* Submerged Cultures. FEMS Microbiology Letters 108(1): 69-73. doi:10.1111/j.1574-6968.1993.tb06075.x
- Jackson MA, Slininger PJ, Bothast RJ (1989) Effects of Zinc, Iron, Cobalt, and Manganese on *Fusarium moniliforme* NRRL 13616 Growth and Fusarin C Biosynthesis in Submerged Cultures. Applied and Environmental Microbiology 55(3): 649-655. doi:10.1128/Aem.55.3.649-655.1989

- Jansen C, von Wettstein D, Schafer W, Kogel KH, Felk A, Maier FJ (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(46): 16892-16897. doi:10.1073/pnas.0508467102
- Jarolim K, Wolters K, Woelflingseder L, Pahlke G, Beisl J, Puntischer H, Braun D, Sulyok M, Warth B, Marko D (2018) The Secondary *Fusarium* Metabolite Aurofusarin Induces Oxidative Stress, Cytotoxicity and Genotoxicity in Human Colon Cells. *Toxicology Letters* 284: 170-183. doi:10.1016/j.toxlet.2017.12.008
- Jennings P, Coates ME, Walsh K, Turner JA, Nicholson P (2004) Determination of Deoxynivalenol- and Nivalenol-Producing Chemotypes of *Fusarium graminearum* Isolated from Wheat Crops in England and Wales. *Plant Pathology* 53(5): 643-652. doi:10.1111/j.0032-0862.2004.01061.x
- John E, Singh KB, Oliver RP, Tan KC (2021) Transcription Factor Control of Virulence in Phytopathogenic Fungi. *Molecular Plant Pathology* 22(7): 858-881. doi: 10.1111/mpp.13056
- Johnson DD, Flaskerud GK, Taylor RD, Satyanarayana V (1998) Economic Impacts of *Fusarium* Head Blight in Wheat. *Agricultural Economics Reports* 23437. doi:10.22004/ag.econ.23437
- Jones PM, O'Mara ML, George AM (2009) ABC Transporters: A Riddle Wrapped in a Mystery inside an Enigma. *Trends in Biochemical Sciences* 34(10): 520-531. doi:10.1016/j.tibs.2009.06.004
- Jones RK (2000) Assessments of *Fusarium* Head Blight of Wheat and Barley in Response to Fungicide Treatment. *Plant Disease* 84(9): 1021-1030. doi:10.1094/Pdis.2000.84.9.1021
- Jorgenson LNM, G.; Kristensen, S.; Orum, J. E. (1999) Estimated Crop Losses and Crop Rotations in a Scenarium without Pesticides. DJF Rapport. Markbrug
- Joseph-Horne T, Hollomon D, Loeffler RS, Kelly SL (1995) Altered P450 Activity Associated with Direct Selection for Fungal Azole Resistance. *FEBS Letters* 374(2): 174-178. doi:10.1016/0014-5793(95)01102-k
- Kang ZS, Buchenauer H (2000) Cytology and Ultrastructure of the Infection of Wheat Spikes by *Fusarium culmorum*. *Mycological Research* 104: 1083-1093. doi:10.1017/S0953756200002495
- Karugia GW, Suga H, Gale LR, Nakajima T, Tomimura K, Hyakumachi M (2009) Population Structure of the *Fusarium graminearum* Species Complex from a Single Japanese Wheat Field Sampled in Two Consecutive Years. *Plant Disease* 93(2): 170-174. doi:10.1094/PDIS-93-2-0170
- Kazan K, Gardiner DM, Manners JM (2012) On the Trail of a Cereal Killer: Recent Advances in *Fusarium graminearum* Pathogenomics and Host Resistance. *Molecular Plant Pathology* 13(4): 399-413. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00762.x
- Keller NP, Turner G, Bennett JW (2005) Fungal Secondary Metabolism - from Biochemistry to Genomics. *Nature Reviews Microbiology* 3(12): 937-947. doi:10.1038/nrmicro1286

- Kelly SL, Lamb DC, Corran AJ, Baldwin BC, Kelly DE (1995) Mode of Action and Resistance to Azole Antifungals Associated with the Formation of 14 α -Methylergosta-8,24(28)-Dien-3 β ,6 α -Diol. *Biochemical Biophysical Research Communications* 207(3): 910-915. doi:10.1006/bbrc.1995.1272
- Keulemans W (2019) Farming without Plant Protection Products. Can We Grow without Using Herbicides, Fungicides and Insecticides? European Parliament, Publications Office. doi:10.2861/05433
- Khalidi N, Collemare J, Lebrun MH, Wolfe KH (2008) Evidence for Horizontal Transfer of a Secondary Metabolite Gene Cluster between Fungi. *Genome Biology* 9(1): R18. doi:10.1186/gb-2008-9-1-r18
- Khan MR, Doohan FM (2009) Bacterium-Mediated Control of *Fusarium* Head Blight Disease of Wheat and Barley and Associated Mycotoxin Contamination of Grain. *Biological Control* 48(1): 42-47. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.08.015
- Kim H, Son H, Lee YW (2014) Effects of Light on Secondary Metabolism and Fungal Development of *Fusarium graminearum*. *Journal of Applied Microbiology* 116(2): 380-389. doi:10.1111/jam.12381
- Kim JE, Han KH, Jin J, Kim H, Kim JC, Yun SH, Lee YW (2005) Putative Polyketide Synthase and Laccase Genes for Biosynthesis of Aurofusarin in *Gibberella zeae*. *Applied and Environmental Microbiology* 71(4): 1701-1708. doi:10.1128/AEM.71.4.1701-1708.2005
- Kim JE, Jin JM, Kim H, Kim JC, Yun SH, Lee YW (2006) GIP2, a Putative Transcription Factor That Regulates the Aurofusarin Biosynthetic Gene Cluster in *Gibberella zeae*. *Applied and Environmental Microbiology* 72(2): 1645-1652. doi:10.1128/Aem.72.2.1645-1652.2006
- Kim JW, Shim SH (2019) The Fungus *Colletotrichum* as a Source for Bioactive Secondary Metabolites. *Archives of Pharmacal Research* 42(9): 735-753. doi:10.1007/s12272-019-01142-z
- Kim Y, Kang IJ, Shin DB, Roh JH, Heu S, Shim HK (2018) Timing of *Fusarium* Head Blight Infection in Rice by Heading Stage. *Mycobiology* 46(3): 283-286. doi:10.1080/12298093.2018.1496637
- Kim YS, Dixon EW, Vincelli P, Farman ML (2003) Field Resistance to Strobilurin (Q(o)I) Fungicides in *Pyricularia grisea* Caused by Mutations in the Mitochondrial Cytochrome b Gene. *Phytopathology* 93(7): 891-900. doi:10.1094/PHYTO.2003.93.7.891
- Kimura M, Tokai T, Takahashi-Ando N, Ohsato S, Fujimura M (2007) Molecular and Genetic Studies of *Fusarium* Trichothecene Biosynthesis: Pathways, Genes, and Evolution. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71(9): 2105-2123. doi:10.1271/bbb.70183
- King R, Urban M, Hammond-Kosack MC, Hassani-Pak K, Hammond-Kosack KE (2015) The Completed Genome Sequence of the Pathogenic Ascomycete Fungus *Fusarium graminearum*. *BMC Genomics* 16:544. doi:10.1186/s12864-015-1756-1

- Klix MB, Beyer M, Verreet A (2006) Declining Triazole Sensitivity in *Gibberella zeae* and Advances in Fungicide Development. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 71(3 Pt A): 849-852
- Klix MB, Verreet JA, Beyer M (2007) Comparison of the Declining Triazole Sensitivity of *Gibberella zeae* and Increased Sensitivity Achieved by Advances in Triazole Fungicide Development. *Crop Protection* 26(4): 683-690. doi:10.1016/j.cropro.2006.06.006
- Klumper W, Kathage J, Qaim M (2013) Perception of Global Food Security Issues in the German Public. *Berichte Uber Landwirtschaft* 91(1). doi:10.22004/ag.econ.138056
- Knutson RDH, C. R.; Smith, E. G.; Contner, S.D., Miller, J. W. (1997) Pesticide-Free Production a 'Disaster'. *Commercial Grower*
- Koch HJ, Pringas C, Maerlaender B (2006) Evaluation of Environmental and Management Effects on *Fusarium* Head Blight Infection and Deoxynivalenol Concentration in the Grain of Winter Wheat. *European Journal of Agronomy* 24(4): 357-366. doi:10.1016/j.eja.2006.01.006
- Kontoyiannis DP, Sagar N, Hirschi KD (1999) Overexpression of Erg11p by the Regulatable *GAL1* Promoter Confers Fluconazole Resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43(11): 2798-2800. doi:10.1128/AAC.43.11.2798
- Kotik A, Trufanova V (1998) Detection of Naphtoquinone Fusariotoxin Aurofusarin in Wheat. *Mikologiya I Fitopatologiya* 32(6): 58-61
- Kretschmer M, Leroux P, De Waard MA, Hahn M (2009) Fungicide-Driven Evolution and Molecular Basis of Multidrug Resistance in Field Populations of the Grey Mould Fungus *Botrytis cinerea*. *PLoS Pathogens* 5(12): e1000696. doi:10.1371/journal.ppat.1000696
- Kröcher VC (2000) Fit Für Neue Fungizide Im Frühjahr 2000 - Erfolgreiche Strategien Zur Pilzbekämpfung in Wintergetreide. *dlz* 1: 34-40
- Kunz S, Deising H, Mendgen K (1997) Acquisition of Resistance to Sterol Demethylation Inhibitors by Populations of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 87(12): 1272-1278. doi:10.1094/PHYTO.1997.87.12.1272
- Lee J, Chang IY, Kim H, Yun SH, Leslie JF, Lee YW (2009) Genetic Diversity and Fitness of *Fusarium graminearum* Populations from Rice in Korea. *Applied and Environmental Microbiology* 75(10): 3289-3295. doi:10.1128/AEM.02287-08
- Lee J, Elliott MR, Kim M, Yamada T, Jung G (2021) A Rapid Molecular Detection System for SdhB and SdhC Point Mutations Conferring Differential Succinate Dehydrogenase Inhibitor Resistance in *Clavireedia* Populations. *Plant Disease* 105(3): 660-666. doi:10.1094/PDIS-04-20-0724-RE

- Lee T, Han YK, Kim KH, Yun SH, Lee YW (2002) Tri13 and Tri7 Determine Deoxynivalenol- and Nivalenol-Producing Chemotypes of *Gibberella zeae*. *Applied and Environmental Microbiology* 68(5): 2148-2154. doi:10.1128/aem.68.5.2148-2154.2002
- Leroux P, Albertini C, Gautier A, Gredt M, Walker AS (2007) Mutations in the CYP51 Gene Correlated with Changes in Sensitivity to Sterol 14 α -Demethylation Inhibitors in Field Isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science* 63(7): 688-698. doi:10.1002/ps.1390
- Leroux P, Walker AS (2011) Multiple Mechanisms Account for Resistance to Sterol 14 α -Demethylation Inhibitors in Field Isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science* 67(1): 44-59. doi:10.1002/ps.2028
- Lesemann SS, Schimpke S, Dunemann F, Deising HB (2006) Mitochondrial Heteroplasmy for the Cytochrome b Gene Controls the Level of Strobilurin Resistance in the Apple Powdery Mildew Fungus *Podosphaera leucotricha* (Ell. & Ev.) ES Salmon. *Journal of Plant Diseases and Protection* 113(6): 259-266. doi:10.1007/Bf03356191
- Leslie JF, Summerell BA (2006) *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing
- Lin H-C, Yu P-L, Chen L-H, Tsai H-C, Chung K-R (2018) A Major Facilitator Superfamily Transporter Regulated by the Stress-Responsive Transcription Factor Yap1 Is Required for Resistance to Fungicides, Xenobiotics, and Oxidants and Full Virulence in *Alternaria alternata*. *Frontiers in Microbiology* 9: 2229. doi: 10.3389/fmicb.2018.02229
- Liu J, Yuan Y, Wu Z, Li N, Chen Y, Qin T, Geng H, Xiong L, Liu D (2015a) A Novel Sterol Regulatory Element-Binding Protein Gene (*sreA*) Identified in *Penicillium digitatum* is Required for Prochloraz Resistance, Full Virulence and *erg11* (*cyp51*) Regulation. *PLoS One* 10(2): e0117115. doi:10.1371/journal.pone.0117115
- Liu TT, Znaidi S, Barker KS, Xu L, Homayouni R, Saidane S, Morschhäuser J, Nantel A, Raymond M, Rogers PD (2007) Genome-Wide Expression and Location Analyses of the *Candida albicans* Tac1p Regulon. *Eukaryotic Cell* 6(11): 2122-2138. doi:10.1128/EC.00070-08
- Liu X, Fu J, Yun YZ, Yin YN, Ma ZH (2011a) A Sterol C-14 Reductase Encoded by FgERG24B Is Responsible for the Intrinsic Resistance of *Fusarium graminearum* to Amine Fungicides. *Microbiology* 157: 1665-1675. doi:10.1099/mic.0.045690-0
- Liu X, Jiang YC, He D, Fang X, Xu JH, Lee YW, Keller NP, Shi JR (2020) Copper Tolerance Mediated by FgAceA and FgCrpA in *Fusarium graminearum*. *Frontiers in Microbiology* 11: 1392. doi:10.3389/fmicb.2020.01392
- Liu X, Yu F, Schnabel G, Wu JB, Wang ZY, Ma ZH (2011b) Paralogous *cyp51* Genes in *Fusarium graminearum* Mediate Differential Sensitivity to Sterol Demethylation Inhibitors. *Fungal Genetics and Biology* 48(2): 113-123. doi:10.1016/j.fgb.2010.10.004

- Liu Y, Liu N, Yin Y, Chen Y, Jiang J, Ma Z (2015b) Histone H3K4 Methylation Regulates Hyphal Growth, Secondary Metabolism and Multiple Stress Responses in *Fusarium graminearum*. *Environmental Microbiology* 17(11): 4615-4630. doi:10.1111/1462-2920.12993
- Liu Z, Jian Y, Chen Y, Kistler HC, He P, Ma Z, Yin Y (2019) A Phosphorylated Transcription Factor Regulates Sterol Biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Nature Communications* 10(1): 1-17. doi: 10.1038/s41467-019-09145-6
- Loffler J, Einsele H, Hebart H, Schumacher U, Hrastnik C, Daum G (2000) Phospholipid and Sterol Analysis of Plasma Membranes of Azole-Resistant *Candida albicans* Strains. *FEMS Microbiology Letters* 185(1): 59-63. doi:10.1111/j.1574-6968.2000.tb09040.x
- Logrieco A, Mule G, Moretti A, Bottalico A (2002) Toxigenic *Fusarium* Species and Mycotoxins Associated with Maize Ear Rot in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 108(7): 597-609. doi:Doi 10.1023/A:1020679029993
- Lohberger A, Coste AT, Sanglard D (2014) Distinct Roles of *Candida albicans* Drug Resistance Transcription Factors TAC1, MRR1, and UPC2 in Virulence. *Eukaryotic Cell* 13(1): 127-142. doi:10.1128/ec.00245-13
- Lu S, Edwards MC (2016) Genome-Wide Analysis of Small Secreted Cysteine-Rich Proteins Identifies Candidate Effector Proteins Potentially Involved in *Fusarium graminearum*-Wheat Interactions. *Phytopathology* 106(2): 166-176. doi:10.1094/PHYTO-09-15-0215-R
- Lucas JA, Hawkins NJ, Fraaije BA (2015) The Evolution of Fungicide Resistance. *Advances in Applied Microbiology* 90: 29-92. doi:10.1016/bs.aambs.2014.09.001
- Lysøe E, Klemsdal SS, Bone KR, Frandsen RJN, Johansen T, Thrane U, Giese H (2006) The PKS4 Gene of *Fusarium graminearum* Is Essential for Zearalenone Production. *Applied and Environmental Microbiology* 72(6): 3924-3932. doi:10.1128/Aem.00963-05
- Lysøe E, Pasquali M, Breakspear A, Kistler HC (2011) The Transcription Factor FgStuAp Influences Spore Development, Pathogenicity, and Secondary Metabolism in *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24(1): 54-67. doi:10.1094/MPMI-03-10-0075
- MacPherson S, Akache B, Weber S, De Deken X, Raymond M, Turcotte B (2005) *Candida albicans* Zinc Cluster Protein Upc2p Confers Resistance to Antifungal Drugs and Is an Activator of Ergosterol Biosynthetic Genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(5): 1745-1752. doi:10.1128/AAC.49.5.1745-1752.2005
- Magan N, Hope R, Colleate A, Baxter ES (2002) Relationship between Growth and Mycotoxin Production by *Fusarium* Species, Biocides and Environment. *European Journal of Plant Pathology* 108(7): 685-690. doi:10.1023/A:1020618728175
- Makuta H, Obara K, Kihara A (2016) Loop 5 Region Is Important for the Activity of the Long-Chain Base Transporter Rsb1. *The Journal of Biochemistry* 161(2): 207-213. doi:10.1093/jb/mvw059

- Malonek S, Rojas MC, Hedden P, Gaskin P, Hopkins P, Tudzynski B (2004) The NADPH-Cytochrome P450 Reductase Gene from *Gibberella fujikuroi* Is Essential for Gibberellin Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 279(24): 25075-25084. doi:10.1074/jbc.M308517200
- Malz S, Grell MN, Thrane C, Maier FJ, Rosager P, Felk A, Albertsen KS, Salomon S, Bohn L, Schafer 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(5): 420-433. doi:10.1016/j.fgb.2005.01.010
- Marie C, Leyde S, White TC (2008) Cytoplasmic Localization of Sterol Transcription Factors Upc2p and Ecm22p in *S. cerevisiae*. *Fungal Genetics and Biology* 45(10): 1430-1438. doi:10.1016/j.fgb.2008.07.004
- Martínez-Culebras PV, Gandía M, Garrigues S, Marcos JF, Manzanares P (2021) Antifungal Peptides and Proteins to Control Toxigenic Fungi and Mycotoxin Biosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences* 22(24): 13261. doi:10.3390/ijms222413261
- Matthies A, Buchenauer H (2000) Effect of Tebuconazole (Folicur(R)) and Prochloraz (Sportale^(R)) Treatments on *Fusarium* Head Scab Development, Yield and Deoxynivalenol (DON) Content in Grains of Wheat Following Artificial Inoculation with *Fusarium culmorum*. *Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection* 107(1): 33-52
- McGrath JP, Varshavsky A (1989) The Yeast STE6 Gene Encodes a Homologue of the Mammalian Multidrug Resistance P-Glycoprotein. *Nature* 340(6232): 400-404. doi:10.1038/340400a0
- McMullen M, Jones R, Gallenberg D (1997) Scab of Wheat and Barley: A Re-Emerging Disease of Devastating Impact. *Plant Disease* 81(12): 1340-1348. doi:10.1094/PDIS.1997.81.12.1340
- Medentsev AG, Akimenko VK (1998) Naphthoquinone Metabolites of the Fungi. *Phytochemistry* 47(6): 935-959. doi:10.1016/S0031-9422(98)80053-8
- Medentsev AG, Maslov AN, Akimenko VK (1990) Naphthoquinone Metabolites of Fungi of the Genus *Fusarium* and *Verticillium* - Mechanism of the Phytotoxic Action. *Biochemistry* 55 (10):1319-1323
- Meemken EM, Qaim M (2018) Organic Agriculture, Food Security, and the Environment. *Annual Review of Resource Economics* 10: 39-63. doi:10.1146/annurev-resource-100517-023252
- Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Melchers WJ, Verweij PE, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL (2007) A New *Aspergillus fumigatus* Resistance Mechanism Conferring in vitro Cross-Resistance to Azole Antifungals Involves a Combination of cyp51A Alterations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51(6): 1897-1904. doi:10.1128/AAC.01092-06
- Mentges M, Glasenapp A, Boenisch M, Malz S, Henrissat B, Frandsen RJ, Güldener U, Münsterkötter M, Bormann J, Lebrun MH (2020) Infection Cushions of *Fusarium graminearum* are Fungal

- Arsenals for Wheat Infection. *Molecular Plant Pathology* 21(8): 1070-1087. doi:10.1111/mpp.12960
- Merhej J, Urban M, Dufresne M, Hammond-Kosack KE, Richard-Forget F, Barreau C (2012) The Velvet Gene, FgVe1, Affects Fungal Development and Positively Regulates Trichothecene Biosynthesis and Pathogenicity in *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant Pathology* 13(4): 363-374. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00755.x
- Mesterhazy A, Bartok T, Lamper C (2003) Influence of Wheat Cultivar, Species of *Fusarium*, and Isolate Aggressiveness on the Efficacy of Fungicides for Control of *Fusarium* Head Blight. *Plant Disease* 87(9): 1107-1115. doi:10.1094/Pdis.2003.87.9.1107
- Michielse C, Pfannmüller A, Macios M, Rengers P, Dzikowska A, Tudzynski B (2014) The Interplay between the GATA Transcription Factors AreA, the Global Nitrogen Regulator and AreB in *Fusarium fujikuroi*. *Molecular Microbiology* 91(3): 472-493. doi:10.1111/mmi.12472
- Mirocha CJ, Pathre SV, Robison TS (1981) Comparative Metabolism of Zearalenone and Transmission into Bovine Milk. *Food and Cosmetics Toxicology* 19(1): 25-30. doi:10.1016/0015-6264(81)90299-6
- Möbius N, Hertweck C (2009) Fungal Phytotoxins as Mediators of Virulence. *Current Opinion in Plant Biology* 12(4): 390-398. doi:10.1016/j.pbi.2009.06.004
- Monk BC, Goffeau A (2008) Outwitting Multidrug Resistance to Antifungals. *Science* 321(5887): 367-369. doi:10.1126/science.1159746
- Morio F, Loge C, Besse B, Hennequin C, Le Pape P (2010) Screening for Amino Acid Substitutions in the *Candida albicans* Erg11 Protein of Azole-Susceptible and Azole-Resistant Clinical Isolates: New Substitutions and a Review of the Literature. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 66(4): 373-384. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2009.11.006
- Morschhäuser J, Barker KS, Liu TT, Blaß-Warmuth J, Homayouni R, Rogers PD (2007) The Transcription Factor Mrr1p Controls Expression of the MDR1 Efflux Pump and Mediates Multidrug Resistance in *Candida albicans*. *PLoS Pathogens* 3(11): e164. doi:10.1371/journal.ppat.0030164
- Muller HM, Reimann J, Schumacher U, Schwadorf K (1997) Fusarium Toxins in Wheat Harvested During Six Years in an Area of Southwest Germany. *Natural Toxins* 5(1): 24-30. doi:10.1002/(SICI)(1997)5:1<24::AID-NT4>3.0.CO;2-#
- Naef A, Defago G (2006) Population Structure of Plant-Pathogenic *Fusarium* Species in Overwintered Stalk Residues from Bt-Transformed and Non-Transformed Maize Crops. *European Journal of Plant Pathology* 116(2): 129-143. doi:10.1007/s10658-006-9048-x
- Nakato R, Sakata T (2021) Methods for ChIP-Seq Analysis: A Practical Workflow and Advanced Applications. *Methods* 187: 44-53. doi:10.1016/j.ymeth.2020.03.005

- Nakaune R, Adachi K, Nawata O, Tomiyama M, Akutsu K, Hibi T (1998) A Novel ATP-Binding Cassette Transporter Involved in Multidrug Resistance in the Phytopathogenic Fungus *Penicillium digitatum*. *Applied and Environmental Microbiology* 64(10): 3983-3988. doi:10.1128/AEM.64.10.3983-3988.1998
- Nakaune R, Hamamoto H, Imada J, Akutsu K, Hibi T (2002) A Novel ABC Transporter Gene, PMR5, is Involved in Multidrug Resistance in the Phytopathogenic Fungus *Penicillium digitatum*. *Molecular Genetics and Genomics* 267(2): 179-185. doi:10.1007/s00438-002-0649-6
- Nasmith CG, Walkowiak S, Wang L, Leung WWY, Gong YC, Johnston A, Harris LJ, Guttman DS, Subramaniam R (2011) Tri6 Is a Global Transcription Regulator in the Phytopathogen *Fusarium graminearum*. *PLoS Pathogens* 7(9): e1002266. doi:10.1371/journal.ppat.1002266
- National Research Council (2000) *The Future Role of Pesticides in US Agriculture*. Washington, DC: The National Academies Press. doi: 10.17226/9598
- Nations U (2019) *World Population Prospects*
- Nganje WE, Bangsund DA, Wilson WW, Tiapo NM, Leistritz FL (2004) Regional Economic Impacts of *Fusarium* Head Blight in Wheat and Barley. *Review of Agricultural Economics* 26(3): 332-347
- Nganje WE, Johnson DD (2003) Economic Impact of *Fusarium* Head Blight in Malting Barley: Blending Margins and Firm-Level Risk. *Current Agriculture, Food and Resource Issues* (4): 1-11. doi:10.22004/ag.econ.45723
- Niehaus EM, Münsterkötter M, Proctor RH, Brown DW, Sharon A, Idan Y, Oren-Young L, Sieber CM, Novák O, Pěňčík A, Tarkowská D, Hromadová K, Freeman S, Maymon M, Elazar M, Youssef SA, El-Shabrawy ES, Shalaby AB, Houterman P, Brock NL, Burkhardt I, Tsavkelova EA, Dickschat JS, Galuszka P, Güldener U, Tudzynski B (2016) Comparative “Omics” of the *Fusarium fujikuroi* Species Complex Highlights Differences in Genetic Potential and Metabolite Synthesis. *Genome Biology and Evolution* 8(11): 3574-3599. doi:10.1093/gbe/evw259
- Niehaus EM, Kleigrewer K, Wiemann P, Studt L, Sieber CMK, Connolly LR, Freitag M, Güldener U, Tudzynski B, Humpf HU (2013) Genetic Manipulation of the *Fusarium fujikuroi* Fusarin Gene Cluster Yields Insight into the Complex Regulation and Fusarin Biosynthetic Pathway. *Chemistry & Biology* 20(8): 1055-1066. doi:10.1016/j.chembiol.2013.07.004
- Nightingale MJ, Marchylo BA, Clear RM, Dexter JE, Preston KR (1999) *Fusarium* Head Blight: Effect of Fungal Proteases on Wheat Storage Proteins. *Cereal Chemistry* 76(1): 150-158. doi:10.1094/Cchem.1999.76.1.150
- Nim S, Rawal MK, Prasad R (2014) FK520 Interacts with the Discrete Intrahelical Amino Acids of Multidrug Transporter Cdr1 Protein and Acts as Antagonist to Selectively Chemosensitize Azole-Resistant Clinical Isolates of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research* 14(4): 624-632. doi:10.1111/1567-1364.12149

- Nishikawa JL, Boeszoermenyi A, Vale-Silva LA, Torelli R, Posteraro B, Sohn Y-J, Ji F, Gelev V, Sanglard D, Sanguinetti M (2016) Inhibiting Fungal Multidrug Resistance by Disrupting an Activator–Mediator Interaction. *Nature* 530(7591): 485-489. doi:10.1038/nature1696
- Noleppa SW, H. (2013) Der gesamtgesellschaftliche Nutzen von Pflanzenschutz in Deutschland. Industrieverband Agrar
- Nutzmann HW, Reyes-Dominguez Y, Scherlach K, Schroeckh V, Horn F, Gacek A, Schumann J, Hertweck C, Strauss J, Brakhage AA (2011) Bacteria-Induced Natural Product Formation in the Fungus *Aspergillus nidulans* Requires Saga/Ada-Mediated Histone Acetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(34): 14282-14287. doi:10.1073/pnas.1103523108
- Nyvall RF, Percich JA, Mirocha CJ (1999) *Fusarium* Head Blight of Cultivated and Natural Wild Rice (*Zizania palustris*) in Minnesota Caused by *Fusarium graminearum* and Associated *Fusarium* spp. *Plant Disease* 83(2): 159-164. doi:10.1094/Pdis.1999.83.2.159
- O'Donnell K, Kistler HC, Tacke BK, Casper HH (2000) Gene Genealogies Reveal Global Phylogeographic Structure and Reproductive Isolation among Lineages of *Fusarium graminearum*, the Fungus Causing Wheat Scab. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(14): 7905-7910. doi:10.1073/pnas.130193297
- O'Donnell K, Sutton DA, Fothergill A, McCarthy D, Rinaldi MG, Brandt ME, Zhang N, Geiser DM (2008) Molecular Phylogenetic Diversity, Multilocus Haplotype Nomenclature, and in vitro Antifungal Resistance within the *Fusarium solani* Species Complex. *Journal of Clinical Microbiology* 46(8): 2477-2490. doi:10.1128/JCM.02371-07
- O'Donnell K, Ward TJ, Geiser DM, Corby Kistler H, Aoki T (2004) Genealogical Concordance between the Mating Type Locus and Seven Other Nuclear Genes Supports Formal Recognition of Nine Phylogenetically Distinct Species within the *Fusarium graminearum* Clade. *Fungal Genetics and Biology* 41(6): 600-623. doi:10.1016/j.fgb.2004.03.003
- O'Donnell K, McCormick SP, Busman M, Proctor RH, Ward TJ, Doehring G, Geiser DM, Alberts JF, Riederer JP (2018) Marasas et al. 1984 “Toxigenic *Fusarium* Species: Identity and Mycotoxicology” Revisited. *Mycologia* 110(6): 1058-1080. doi:10.1080/00275514.2018.1519773
- Obst A, Obst L, Streckert G (1990) Natürliche Gifte Im Getreide - Eine Gefahr Für Unsere Lebensmittel? Fördergemeinschaft Integrierter Pflanzenbau 6
- Ochiai N, Tokai T, Nishiuchi T, Takahashi-Ando N, Fujimura M, Kimura M (2007) Involvement of the Osmosensor Histidine Kinase and Osmotic Stress-Activated Protein Kinases in the Regulation of Secondary Metabolism in *Fusarium graminearum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 363(3): 639-644. doi:10.1016/j.bbrc.2007.09.027

- Oerke EC, Dehne HW (2004) Safeguarding Production - Losses in Major Crops and the Role of Crop Protection. *Crop Protection* 23(4): 275-285. doi:10.1016/j.cropro.2003.10.001
- Oide S, Berthiller F, Wiesenberger G, Adam G, Turgeon BG (2015) Individual and Combined Roles of Malonichrome, Ferricrocin, and TAFC Siderophores in *Fusarium graminearum* Pathogenic and Sexual Development. *Frontiers in Microbiology* 5: 759. doi:10.3389/fmicb.2014.00759
- Oka K, Akamatsu H, Kodama M, Nakajima H, Kawada T, Otani H (2005) Host-Specific AB-Toxin Production by Germinating Spores of *Alternaria brassicicola* Is Induced by a Host-Derived Oligosaccharide. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 66(1-2): 12-19. doi:10.1016/j.pmpp.2005.03.005
- Oldham ML, Davidson AL, Chen J (2008) Structural Insights into ABC Transporter Mechanism. *Current Opinion in Structural Biology* 18(6): 726-733. doi:10.1016/j.sbi.2008.09.007
- Omrane S, Audeon C, Ignace A, Duplaix C, Aouini L, Kema G, Walker AS, Fillinger S (2017) Plasticity of the MFS1 Promoter Leads to Multidrug Resistance in the Wheat Pathogen *Zymoseptoria tritici*. *mSphere* 2(5): e00393-17. doi:10.1128/mSphere.00393-17
- Pao SS, Paulsen IT, Saier MH, Jr (1998) Major Facilitator Superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(1): 1-34. doi:10.1128/MMBR.62.1.1-34.1998
- Parry DW, Jenkinson P, McLeod L (1995) *Fusarium* Ear Blight (Scab) in Small-Grain Cereals – a Review. *Plant Pathology* 44(2):207-238. doi:10.1111/j.1365-3059.1995.tb02773.x
- Paul PA, Lipps PE, Hershman DE, McMullen MP, Draper MA, Madden LV (2008) Efficacy of Triazole-Based Fungicides for *Fusarium* Head Blight and Deoxynivalenol Control in Wheat: A Multivariate Meta-Analysis. *Phytopathology* 98(9): 999-1011. doi:10.1094/Phyto-98-9-0999
- Paul S, Moye-Rowley WS (2014) Multidrug Resistance in Fungi: Regulation of Transporter-Encoding Gene Expression. *Frontiers in Physiology* 5: 143 doi: 10.3389/fphys.2014.00143
- Pelaez F (2004) Biological Activities of Fungal Metabolites. *Handbook of Industrial Mycology*
- Pereyra SA, Dill-Macky R (2008) Colonization of the Residues of Diverse Plant Species by *Gibberella zeae* and Their Contribution to *Fusarium* Head Blight Inoculum. *Plant Disease* 92(5): 800-807. doi:10.1094/Pdis-92-5-0800
- Pereyra SA, Dill-Macky R, Sims AL (2004) Survival and Inoculum Production of *Gibberella zeae* in Wheat Residue. *Plant Disease* 88(7): 724-730. doi:10.1094/Pdis.2004.88.7.724
- Pestka JJ, Smolinski AT (2005) Deoxynivalenol: Toxicology and Potential Effects on Humans. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B Critical Reviews* 8(1): 39-69. doi:10.1080/10937400590889458
- Pfannmüller A, Leufken J, Studt L, Michielse CB, Sieber CM, Güldener U, Hawat S, Hippler M, Fufezan C, Tudzynski B (2017) Comparative Transcriptome and Proteome Analysis Reveals a Global

- Impact of the Nitrogen Regulators Area and Areb on Secondary Metabolism in *Fusarium fujikuroi*. PLoS One 12(4): e0176194. doi:10.1371/journal.pone.0176194
- Pinjon E, Moran GP, Jackson CJ, Kelly SL, Sanglard D, Coleman DC, Sullivan DJ (2003) Molecular Mechanisms of Itraconazole Resistance in *Candida dubliniensis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 47(8): 2424-2437. doi:10.1128/AAC.47.8.2424-2437.2003
- Pirgozliev SR, Edwards SG, Hare MC, Jenkinson P (2003) Strategies for the Control of *Fusarium* Head Blight in Cereals. European Journal of Plant Pathology 109(7): 731-742. doi:10.1023/A:1026034509247
- Poehling HM, Verreet A (2013) Lehrbuch Der Phytomedizin. Eugen Ulmer
- Prelusky DB, Scott PM, Trenholm HL, Lawrence GA (1990) Minimal Transmission of Zearalenone to Milk of Dairy Cows. Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes 25(1): 87-103. doi:10.1080/03601239009372678
- Proctor RH, McCormick SP, Alexander NJ, Desjardins AE (2009) Evidence That a Secondary Metabolic Biosynthetic Gene Cluster Has Grown by Gene Relocation During Evolution of the Filamentous Fungus *Fusarium*. Molecular Microbiology 74(5): 1128-1142. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06927.x
- Qaim M (2017) Globalisation of Agrifood Systems and Sustainable Nutrition. Proceedings of the Nutrition Society 76(1): 12-21. doi:10.1017/S0029665116000598
- Ramirez ML, Chulze S, Magan N (2004) Impact of Environmental Factors and Fungicides on Growth and Deoxinivalenol Production by *Fusarium graminearum* Isolates from Argentinian Wheat. Crop Protection 23(2): 117-125. doi:10.1016/j.cropro.2003.07.005
- Ramón AM, Fonzi WA (2003) Diverged Binding Specificity of Rim101p, the *Candida albicans* Ortholog of PacC. Eukaryotic Cell 2(4): 718-728. doi:10.1128/EC.2.4.718-728.2003
- Rath M, Crenshaw NJ, Lofton LW, Glenn AE, Gold SE (2020) FvSTUA is a Key Regulator of Sporulation, Toxin Synthesis, and Virulence in *Fusarium verticillioides*. Molecular Plant-Microbe Interactions 33(7): 958-971. doi:10.1094/Mpmi-09-19-0271-R
- Rees DO, Bushby N, Cox RJ, Harding JR, Simpson TJ, Willis CL (2007) Synthesis of [1,2-¹³C₂, ¹⁵N]-L-Homoserine and Its Incorporation by the PKS-NRPS System of *Fusarium moniliforme* into the Mycotoxin Fusarin C. ChemBiochem 8(1): 46-50. doi:10.1002/cbic.200600404
- Reimann S, Deising HB (2005) Inhibition of Efflux Transporter-Mediated Fungicide Resistance in *Pyrenophora tritici-repentis* by a Derivative of 4'-Hydroxyflavone and Enhancement of Fungicide Activity. Applied and Environmental Microbiology 71(6): 3269-3275. doi:10.1128/AEM.71.6.3269-3275.2005
- Rosling H (2018) Factfulness: Ten Reasons We're Wrong About the World - and Why Things Are Better Than You Think. Hodder and Stoughton Ltd. London, UK

- Rossi V, Languasco L, Patteri E, Giosue S (2002) Dynamics of Airborne *Fusarium* Macroconidia in Wheat Fields Naturally Affected by Head Blight. *Journal of Plant Pathology* 84(1): 53-64
- Ruan R, Wang M, Liu X, Sun X, Chung K-R, Li H (2017) Functional Analysis of Two Sterol Regulatory Element Binding Proteins in *Penicillium digitatum*. *PLoS One* 12(5): e0176485. doi:10.1371/journal.pone.0176485
- Ruiz E, Donoso C, Gonzalez F, Becerra J, Marticorena C, Silva M (1999) Phenetic Relationships between Juan Fernandez and Continental Chilean Species of *Sophora* (Fabaceae) Based on Flavonoid Patterns. *Boletín De La Sociedad Chilena De Química* 44(3): 351-356
- Rupp S, Plesken C, Rumsey S, Dowling M, Schnabel G, Weber RWS, Hahn M (2017) *Botrytis fragariae*, a New Species Causing Gray Mold on Strawberries, Shows High Frequencies of Specific and Efflux-Based Fungicide Resistance. *Applied and Environmental Microbiology* 83(9): e00269-17. doi:10.1128/AEM.00269-17
- Salgado J, Paul PA, Willyerd K, Madden LV (2012) A Cost-Benefit Assessment of Integrated Management Strategies for *Fusarium* Head Blight and Deoxynivalenol Control in Wheat. *Phytopathology* 102(9): 8
- Samaras A, Ntasiou P, Myresiotis C, Karaoglanidis G (2020) Multidrug Resistance of *Penicillium expansum* to Fungicides: Whole Transcriptome Analysis of Mdr Strains Reveals Overexpression of Efflux Transporter Genes. *International Journal of Food Microbiology* 335: 108896. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108896
- Sánchez-Pulido L, Martín-Belmonte F, Valencia A, Alonso MA (2002) MARVEL: A Conserved Domain Involved in Membrane Apposition Events. *Trends in Biochemical Sciences* 27(12): 599-601. doi:10.1016/s0968-0004(02)02229-6
- Sanchez-Pulido L, Ponting CP (2014) TM6SF2 and MAC30, New Enzyme Homologs in Sterol Metabolism and Common Metabolic Disease. *Frontiers in Genetics* 5: 439. doi:10.3389/fgene.2014.00439
- Sang H, Hulvey J, Popko JT, Lopes J, Swaminathan A, Chang T, Jung G (2015) A Pleiotropic Drug Resistance Transporter Is Involved in Reduced Sensitivity to Multiple Fungicide Classes in *Sclerotinia homoeocarpa* (FT Bennett). *Molecular Plant Pathology* 16(3): 251-261. doi:10.1111/mpp.12174
- Sang H, Hulvey JP, Green R, Xu H, Im J, Chang T, Jung G (2018) A Xenobiotic Detoxification Pathway through Transcriptional Regulation in Filamentous Fungi. *mBio* 9(4): e00457-18. doi:10.1128/mBio.00457-18
- Sanglard D, Coste A, Ferrari S (2009) Antifungal Drug Resistance Mechanisms in Fungal Pathogens from the Perspective of Transcriptional Gene Regulation. *FEMS Yeast Research* 9(7): 1029-1050. doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00578.x

- Sanglard D, Ischer F, Koymans L, Bille J (1998) Amino Acid Substitutions in the Cytochrome P-450 Lanosterol 14 α -Demethylase (CYP51A1) from Azole-Resistant *Candida albicans* Clinical Isolates Contribute to Resistance to Azole Antifungal Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42(2): 241-253. doi: 10.1128/AAC.42.2.241
- Sanglard D, Ischer F, Parkinson T, Falconer D, Bille J (2003) *Candida albicans* Mutations in the Ergosterol Biosynthetic Pathway and Resistance to Several Antifungal Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47(8): 2404-2412. doi:10.1128/AAC.47.8.2404-2412.2003
- Sarver BA, Ward TJ, Gale LR, Broz K, Kistler HC, Aoki T, Nicholson P, Carter J, O'Donnell K (2011) Novel *Fusarium* Head Blight Pathogens from Nepal and Louisiana Revealed by Multilocus Genealogical Concordance. *Fungal Genetics and Biology* 48(12): 1096-1107. doi:10.1016/j.fgb.2011.09.002
- Satterlee T, Nepal B, Lorber S, Puel O, Calvo AM (2020) The Transcriptional Regulator HbxA Governs Development, Secondary Metabolism, and Virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 86(3): e01779-19. doi:10.1128/AEM.01779-19.
- Saurin W, Hofnung M, Dassa E (1999) Getting in or Out: Early Segregation between Importers and Exporters in the Evolution of ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters. *Journal of Molecular Evolution* 48(1): 22-41. doi:10.1007/pl00006442
- Schaafsma AW, Tamburic-Ilinic L, Miller JD, Hooker DC (2001) Agronomic Considerations for Reducing Deoxynivalenol in Wheat Grain. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie* 23(3): 279-285. doi:10.1080/07060660109506941
- Schisler DA, Khan NI, Boehm MJ, Lipps PE, Slininger PJ, Zhang S (2006) Selection and Evaluation of the Potential of Choline-Metabolizing Microbial Strains to Reduce *Fusarium* Head Blight. *Biological Control* 39(3): 497-506. doi:10.1016/j.biocontrol.2006.08.007
- Schnabel G, Jones AL (2001) The 14 α -Demethylase(CYP51A1) Gene Is Overexpressed in *Venturia inaequalis* Strains Resistant to Myclobutanil. *Phytopathology* 91(1): 102-110. doi:10.1094/PHYTO.2001.91.1.102
- Seifert KA, Gams W (2011) The Genera of Hyphomycetes - 2011 Update. *Persoonia* 27: 119-129. doi:10.3767/003158511X617435
- Selitrennikoff CP (2001) Antifungal Proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 67(7): 2883-2894. doi:10.1128/AEM.67.7.2883-2894.2001
- Sellam A, Askew C, Epp E, Lavoie H, Whiteway M, Nantel A (2009) Genome-Wide Mapping of the Coactivator Ada2p Yields Insight into the Functional Roles of SAGA/ADA Complex in *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell* 20(9): 2389-2400. doi:10.1091/mbc.E08-11-1093
- Selmecki A, Forche A, Berman J (2006) Aneuploidy and Isochromosome Formation in Drug-Resistant *Candida albicans*. *Science* 313(5785): 367-370. doi:10.1126/science.1128242

- Seufert V, Ramankutty N, Mayerhofer T (2017) What Is This Thing Called Organic? - How Organic Farming Is Codified in Regulations. *Food Policy* 68:10-20. doi:10.1016/j.foodpol.2016.12.009
- Shaner G (2003) Epidemiology of *Fusarium* Head Blight of Small Grain Cereals in North America. APS Press: 84-119
- Shaw WV (1983) Chloramphenicol Acetyltransferase: Enzymology and Molecular Biology. *Critical Reviews in Biochemistry* 14(1): 1-46. doi:10.3109/10409238309102789
- Shostak K, Bonner C, Sproule A, Thapa I, Shields SWJ, Blackwell B, Vierula J, Overy D, Subramaniam R (2020) Activation of Biosynthetic Gene Clusters by the Global Transcriptional Regulator TRI6 in *Fusarium graminearum*. *Molecular Microbiology* 114(4): 664-680. doi:10.1111/mmi.14575
- Sieber CM, Lee W, Wong P, Munsterkotter M, Mewes HW, Schmeitzl C, Varga E, Berthiller F, Adam G, Guldener U (2014) The *Fusarium graminearum* Genome Reveals More Secondary Metabolite Gene Clusters and Hints of Horizontal Gene Transfer. *PLoS One* 9(10): e110311. doi:10.1371/journal.pone.0110311
- Silva LV, Sanguinetti M, Vandeputte P, Torelli R, Rochat B, Sanglard D (2013) Milbemycins: More Than Efflux Inhibitors for Fungal Pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57(2): 873-886. doi:10.1128/Aac.02040-12
- Silver PM, Oliver BG, White TC (2004) Role of *Candida albicans* Transcription Factor Upc2p in Drug Resistance and Sterol Metabolism. *Eukaryotic Cell* 3(6): 1391-1397
- Simpson DR, Weston GE, Turner JA, Jennings P, Nicholson P (2001) Differential Control of Head Blight Pathogens of Wheat by Fungicides and Consequences for Mycotoxin Contamination of Grain. *European Journal of Plant Pathology* 107(4): 421-431. doi:10.1023/A:1011225817707
- Skadsen RW, Hohn TA (2004) Use of *Fusarium graminearum* Transformed with gfp to Follow Infection Patterns in Barley and Arabidopsis. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 64(1): 45-53. doi:10.1016/j.pmpp.2004.04.003
- Smith DJ, Earl AJ, Turner G (1990) The Multifunctional Peptide Synthetase Performing the First Step of Penicillin Biosynthesis in *Penicillium chrysogenum* is a 421,073 Dalton Protein Similar to *Bacillus brevis* Peptide Antibiotic Synthetases. *The EMBO Journal* 9(9): 2743-2750. doi:10.1002/j.1460-2075.1990.tb07461.x
- Snijders CHA (1990) Genetic-Variation for Resistance to *Fusarium* Head Blight in Bread Wheat. *Euphytica* 50(2): 171-179. doi:10.1007/Bf00023642
- Snyder BA, Nicholson RL (1990) Synthesis of Phytoalexins in Sorghum as a Site-Specific Response to Fungal Ingress. *Science* 248(4963): 1637-1639. doi:10.1126/science.248.4963.1637
- Song Z, Cox RJ, Lazarus CM, Simpson TT (2004) Fusarin C Biosynthesis in *Fusarium moniliforme* and *Fusarium venenatum*. *ChemBiochem* 5(9): 1196-1203. doi:10.1002/cbic.200400138

- Soustre I, Letourneux Y, Karst F (1996) Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* RTA1 Gene Involved in 7-Aminocholesterol Resistance. *Current Genetics* 30(2): 121-125. doi:10.1007/s002940050110
- Stack RW (2003) History of *Fusarium* Head Blight with Emphasis on North America. APS Press, St. Paul: 1-34
- Starkey DE, Ward TJ, Aoki T, Gale LR, Kistler HC, Geiser DM, Suga H, Toth B, Varga J, O'Donnell K (2007) Global Molecular Surveillance Reveals Novel *Fusarium* Head Blight Species and Trichothecene Toxin Diversity. *Fungal Genetics and Biology* 44(11): 1191-1204. doi:10.1016/j.fgb.2007.03.001
- Stergiopoulos I, Zwiers LH, De Waard MA (2003) The ABC Transporter MgAtr4 Is a Virulence Factor of *Mycosphaerella graminicola* that Affects Colonization of Substomatal Cavities in Wheat Leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16(8): 689-698. doi:10.1094/MPMI.2003.16.8.689
- Stoldt VR, Sonneborn A, Leuker CE, Ernst JF (1997) Efg1p, an Essential Regulator of Morphogenesis of the Human Pathogen *Candida albicans*, is a Member of a Conserved Class of bHLH Proteins Regulating Morphogenetic Processes in Fungi. *The EMBO Journal* 16(8): 1982-1991. doi:10.1093/emboj/16.8.1982
- Suga H, Karugia GW, Ward T, Gale LR, Tomimura K, Nakajima T, Miyasaka A, Koizumi S, Kageyama K, Hyakumachi M (2008) Molecular Characterization of the *Fusarium graminearum* Species Complex in Japan. *Phytopathology* 98(2): 159-166. doi:10.1094/PHYTO-98-2-0159
- Sun X, Wang J, Feng D, Ma Z, Li H (2011) PdCYP51B, a New Putative Sterol 14 α -Demethylase Gene of *Penicillium digitatum* Involved in Resistance to Imazalil and Other Fungicides Inhibiting Ergosterol Synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91(4): 1107-1119. doi:10.1007/s00253-011-3355-7
- Sutton JC (1982) Epidemiology of Wheat Head Blight and Maize Ear Rot Caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 4(2): 195-209. doi:10.1080/07060668209501326
- Talas F, Parzies HK, Miedaner T (2011) Diversity in Genetic Structure and Chemotype Composition of *Fusarium graminearum* Sensu Stricto Populations Causing Wheat Head Blight in Individual Fields in Germany. *European Journal of Plant Pathology* 131(1): 39-48. doi:10.1007/s10658-011-9785-3
- Tanney JB, McMullin DR, Green BD, Miller JD, Seifert KA (2016) Production of Antifungal and Antiinsectan Metabolites by the *Picea* Endophyte *Diaporthe maritima* sp. nov. *Fungal Biology* 120(11): 1448-1457. doi:10.1016/j.funbio.2016.05.007

- Thakur JK, Arthanari H, Yang F, Pan S-J, Fan X, Breger J, Frueh DP, Gulshan K, Li DK, Mylonakis E (2008) A Nuclear Receptor-Like Pathway Regulating Multidrug Resistance in Fungi. *Nature* 452(7187): 604-609. doi:10.1038/nature06836
- Tiedemann A (2015) Offener Brief an Die Ard Zur Sendung Plusminus „Pestizide in Unseren Nahrungsmitteln“ Vom 14.10.2015. Stallbesuch. <https://www.stallbesuch.de/offener-brief-zu-plusminus/>
- Tilburn J, Sarkar S, Widdick D, Espeso E, Orejas M, Mungroo J, Penalva M, Arst Jr H (1995) The *Aspergillus* PacC Zinc Finger Transcription Factor Mediates Regulation of Both Acid- and Alkaline-Expressed Genes by Ambient pH. *The EMBO Journal* 14(4): 779-790. doi:10.1002/j.1460-2075.1995.tb07056.x.
- Tominaga M, Lee YH, Hayashi R, Suzuki Y, Yamada O, Sakamoto K, Gotoh K, Akita O (2006) Molecular Analysis of an Inactive Aflatoxin Biosynthesis Gene Cluster in *Aspergillus oryzae* RIB Strains. *Applied and Environmental Microbiology* 72(1): 484-490. doi:10.1128/AEM.72.1.484-490.2006
- Torelli R, Posteraro B, Ferrari S, La Sorda M, Fadda G, Sanglard D, Sanguinetti M (2008) The ATP-Binding Cassette Transporter–Encoding Gene CgSNQ2 is Contributing to the CgPDR1-Dependent Azole Resistance of *Candida glabrata*. *Molecular Microbiology* 68(1): 186-201. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06143.x
- Trail F, Common R (2000) Perithecial Development by *Gibberella zeae*: A Light Microscopy Study. *Mycologia* 92(1): 130-138. doi:10.2307/3761457
- Trail F, Gaffoor I, Vogel S (2005) Ejection Mechanics and Trajectory of the Ascospores of *Gibberella zeae* (Anamorph *Fusarium Graminearum*). *Fungal Genetics and Biology* 42(6): 528-533. doi:10.1016/j.fgb.2005.03.008
- Trower MK, Clark KG (1990) PCR Cloning of a Streptomycin Phosphotransferase (aphE) Gene from *Streptomyces griseus* ATCC 12475. *Nucleic Acids Research* 18(15): 4615. doi:10.1093/nar/18.15.4615
- Tsai H-F, Krol AA, Sarti KE, Bennett JE (2006) *Candida glabrata* PDR1, a Transcriptional Regulator of a Pleiotropic Drug Resistance Network, Mediates Azole Resistance in Clinical Isolates and Petite Mutants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(4): 1384-1392. doi:10.1128/AAC.50.4.1384-1392.2006
- Tsai H-F, Sammons LR, Zhang X, Suffis SD, Su Q, Myers TG, Marr KA, Bennett JE (2010) Microarray and Molecular Analyses of the Azole Resistance Mechanism in *Candida glabrata* Oropharyngeal Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(8): 3308-3317. doi: 10.1128/AAC.00535-10

- Ueno Y (1985) The Toxicology of Mycotoxins. *Critical Reviews in Toxicology* 14(2): 99-132. doi:10.3109/10408448509089851
- Umweltbundesamt (2022) Pflanzenschutzmittelverwendung in Der Landwirtschaft. <https://www.umweltbundesamt.de/daten/land-forstwirtschaft/pflanzenschutzmittelverwendung-in-der#zulassung-von-pflanzenschutzmitteln>.
- Urban M, Bhargava T, Hamer JE (1999) An ATP-Driven Efflux Pump Is a Novel Pathogenicity Factor in Rice Blast Disease. *The EMBO Journal* 18(3): 512-521. doi:10.1093/emboj/18.3.512
- Urban M, Daniels S, Mott E, Hammond-Kosack K (2002) *Arabidopsis* Is Susceptible to the Cereal Ear Blight Fungal Pathogens *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. *Plant Journal* 32(6): 961-973. doi:10.1046/j.1365-313X.2002.01480.x
- Valentim CLL, Cioli D, Chevalier FD, Cao X, Taylor AB, Holloway SP, Pica-Mattocchia L, Guidi A, Basso A, Tsai IJ, Berriman M, Carvalho-Queiroz C, Almeida M, Aguilar H, Frantz DE, Hart PJ, LoVerde PT, Anderson TJC (2013) Genetic and Molecular Basis of Drug Resistance and Species-Specific Drug Action in *Schistosoma* Parasites. *Science* 342(6164): 1385-1839. doi:10.1126/science.1243106
- Valkama E, Salminen JP, Koricheva J, Pihlaja K (2004) Changes in Leaf Trichomes and Epicuticular Flavonoids During Leaf Development in Three Birch Taxa. *Annals of Botany* 94(2): 233-242. doi:10.1093/aob/mch131
- van Zuylen L, Nooter K, Sparreboom A, Verweij J (2000) Development of Multidrug-Resistance Convertors: Sense or Nonsense? *Investigational New Drugs* 18(3): 205-220. doi:10.1023/a:1006487003814
- Vermitsky JP, Earhart KD, Smith WL, Homayouni R, Edlind TD, Rogers PD (2006) Pdr1 Regulates Multidrug Resistance in *Candida glabrata*: Gene Disruption and Genome-Wide Expression Studies. *Molecular Microbiology* 61(3): 704-722. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05235.x
- Vik Å, Rine J (2001) Upc2p and Ecm22p, Dual Regulators of Sterol Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 21(19): 6395-6405. doi: 10.1128/MCB.21.19.6395-6405.2001
- Vu BG, Stamnes MA, Li Y, Rogers PD, Moye-Rowley WS (2021) The *Candida glabrata* Upc2A Transcription Factor Is a Global Regulator of Antifungal Drug Resistance Pathways. *PLoS Genetics* 17(9): e1009582. doi: 10.1371/journal.pgen.1009582
- Waalwijk C, Kastelein P, de Vries I, Kerényi Z, van der Lee T, Hesselink T, Kohl J, Kema G (2003) Major Changes in *Fusarium* spp. in Wheat in The Netherlands. *European Journal of Plant Pathology* 109(7): 743-754. doi:10.1023/A:1026086510156
- Walter S, Nicholson P, Doohan FM (2010) Action and Reaction of Host and Pathogen During *Fusarium* Head Blight Disease. *New Phytologist* 185(1): 54-66. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.03041.x

- Wan YF, Yen C, Yang JL (1997) The Diversity of Head-Scab Resistance in *Triticeae* and Their Relation to Ecological Conditions. *Euphytica* 97(3): 277-281. doi:10.1023/A:1003028324059
- Wang JH, Wieser H, Pawelzik E, Weinert J, Keutgen AJ, Wolf GA (2005) Impact of the Fungal Protease Produced by *Fusarium culmorum* on the Protein Quality and Breadmaking Properties of Winter Wheat. *European Food Research and Technology* 220(5-6): 552-559. doi:10.1007/s00217-004-1112-1
- Wang S, Shi L, Hu Y, Liu R, Ren A, Zhu J, Zhao M (2018) Roles of the Skn7 Response Regulator in Stress Resistance, Cell Wall Integrity and GA Biosynthesis in *Ganoderma lucidum*. *Fungal Genetics and Biology* 114: 12-23. doi: 10.1016/j.fgb.2018.03.002
- Wang YZ (1997) Epidemiology and Management of Wheat Scab in China. In: *Fusarium Head Scab: Global Status and Future Prospects*. CIMMYT, El Batan, Mexico, pp 97
- Ward TJ, Clear RM, Rooney AP, O'Donnell K, Gaba D, Patrick S, Starkey DE, Gilbert J, Geiser DM, Nowicki TW (2008) An Adaptive Evolutionary Shift in *Fusarium* Head Blight Pathogen Populations Is Driving the Rapid Spread of More Toxigenic *Fusarium graminearum* in North America. *Fungal Genetics and Biology* 45(4): 473-484. doi:10.1016/j.fgb.2007.10.003
- Warrilow AG, Mullins JG, Hull CM, Parker JE, Lamb DC, Kelly DE, Kelly SL (2012) S279 Point Mutations in *Candida albicans* Sterol 14- α Demethylase (CYP51) Reduce in vitro Inhibition by Fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56(4): 2099-2107. doi:10.1128/AAC.05389-11
- Watson AJ, Fuller LJ, Jeenes DJ, Archer DB (1999) Homologs of Aflatoxin Biosynthesis Genes and Sequence of aflR in *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*. *Applied and Environmental Microbiology* 65(1): 307-310. doi:10.1128/AEM.65.1.307-310.1999
- White TC (1997) The Presence of an R467K Amino Acid Substitution and Loss of Allelic Variation Correlate with an Azole-Resistant Lanosterol 14 α Demethylase in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41(7): 1488-1494. doi:10.1128/AAC.41.7.1488
- Wiemann P, Brown DW, Kleigrewe K, Bok JW, Keller NP, Humpf HU, Tudzynski B (2010) FfVel1 and FfLae1, Components of a Velvet-Like Complex in *Fusarium fujikuroi*, Affect Differentiation, Secondary Metabolism and Virulence. *Molecular Microbiology* 77(4): 972-994. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07263.x
- Willyerd KT, Li C, Madden LV, Bradley CA, Bergstrom GC, Sweets LE, McMullen M, Ransom JK, Grybauskas A, Osborne L, Wegulo SN, Hershman DE, Wise K, Bockus WW, Groth D, Dill-Macky R, Milus E, Esker PD, Waxman KD, Adee EA, Ebelhar SE, Young BG, Paul PA (2012) Efficacy and Stability of Integrating Fungicide and Cultivar Resistance to Manage *Fusarium* Head Blight and Deoxynivalenol in Wheat. *Plant Disease* 96(7): 957-967. doi:10.1094/Pdis-09-11-0763

- Wolpert TJ, Dunkle LD, Ciuffetti LM (2002) Host-Selective Toxins and Avirulence Determinants: What's in a Name? *Annual Review of Phytopathology* 40(1): 251-285. doi:10.1146/annurev.phyto.40.011402.114210
- Wyand RA, Brown JKM (2005) Sequence Variation in the CYP51 Gene of *Blumeria graminis* Associated with Resistance to Sterol Demethylase Inhibiting Fungicides. *Fungal Genetics and Biology* 42(8): 726-735. doi:10.1016/j.fgb.2005.04.007
- Xu SQ, Wang JH, Wang HX, Bao YX, Li YS, Govindaraju M, Yao W, Chen BS, Zhang MQ (2019a) Molecular Characterization of Carbendazim Resistance of *Fusarium* Species Complex That Causes Sugarcane Pokkah Boeng Disease. *BMC Genomics* 20(1): 115. doi:10.1186/s12864-019-5479-6
- Xu X, Nicholson P (2009) Community Ecology of Fungal Pathogens Causing Wheat Head Blight. *Annual Review of Phytopathology* 47: 83-103. doi:10.1146/annurev-phyto-080508-081737
- Xu XM (2003) Effects of Environmental Conditions on the Development of *Fusarium* Ear Blight. *European Journal of Plant Pathology* 109(7): 683-689. doi:10.1023/A:1026022223359
- Xu Y, Vinas M, Alsarrag A, Su L, Pfohl K, Rohlfs M, Schafer W, Chen W, Karlovsky P (2019b) Bis-Naphthopyrone Pigments Protect Filamentous Ascomycetes from a Wide Range of Predators. *Nature Communications* 10(1): 3579. doi:10.1038/s41467-019-11377-5
- Yang H, Tong J, Lee CW, Ha S, Eom SH, Im YJ (2015) Structural Mechanism of Ergosterol Regulation by Fungal Sterol Transcription Factor Upc2. *Nature Communications* 6: 6129. doi:10.1038/ncomms7129
- Yao G, Zhang F, Nie X, Wang X, Yuan J, Zhuang Z, Wang S (2017) Essential APSES Transcription Factors for Mycotoxin Synthesis, Fungal Development, and Pathogenicity in *Aspergillus flavus*. *Frontiers in Microbiology* 8: 2277. doi: 10.3389/fmicb.2017.02277
- Yi C, Kaul HP, Kubler E, Schwadorf K, Aufhammer W (2001) Head Blight (*Fusarium Graminearum*) and Deoxynivalenol Concentration in Winter Wheat as Affected by Pre-Crop, Soil Tillage and Nitrogen Fertilization. *Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection* 108(3): 217-230
- Yi L, Yang M, Waalwijk C, Xu J, Xu J, Molnár O, Chen W, Feng J, Zhang H (2022) Dynamics of Carbendazim-Resistant Frequency of Pathogen Associated with the Epidemic of *Fusarium* Head Blight. *Plant Disease* (online ahead of print). doi:10.1094/PDIS-08-22-1998-SR
- Yin Y, Liu X, Li B, Ma Z (2009) Characterization of Sterol Demethylation Inhibitor-Resistant Isolates of *Fusarium asiaticum* and *F. graminearum* Collected from Wheat in China. *Phytopathology* 99(5): 487-497. doi:10.1094/Phyto-99-5-0487

- Yli-Mattila T, Gagkaeva T, Ward TJ, Aoki T, Kistler HC, O'Donnell K (2009) A Novel Asian Clade within the *Fusarium graminearum* Species Complex Includes a Newly Discovered Cereal Head Blight Pathogen from the Russian Far East. *Mycologia* 101(6): 841-852. doi:10.3852/08-217
- Zeilinger S, García-Estrada C, Martín J-F (2015) Fungal Secondary Metabolites in the “OMICS” Era. In: *Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites, Volume 2*. Springer, pp 1-12
- Zhao C, Li Y, Liang Z, Gao L, Han C, Wu X (2022a) Molecular Mechanisms Associated with the Resistance of *Rhizoctonia solani* AG-4 Isolates to the Succinate Dehydrogenase Inhibitor Thifluzamide. *Phytopathology* 112(3): 567-578. doi:10.1094/PHYTO-06-21-0266-R
- Zhao Y, Sun H, Li J, Ju C, Huang J (2022b) The Transcription Factor Fgatrr Regulates Asexual and Sexual Development, Virulence, and Don Production and Contributes to Intrinsic Resistance to Azole Fungicides in *Fusarium graminearum*. *Biology* 11(2): 326. doi:10.3390/biology11020326
- Znaidi S, Weber S, Zin Al-Abdin O, Bomme P, Saidane S, Drouin S, Lemieux S, De Deken X, Robert F, Raymond M (2008) Genomewide Location Analysis of *Candida albicans* Upc2p, a Regulator of Sterol Metabolism and Azole Drug Resistance. *Eukaryotic Cell* 7(5): 836-847
- Zwiers LH, De Waard MA (2000) Characterization of the ABC Transporter Genes MgAtr1 and MgAtr2 from the Wheat Pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genetics and Biology* 30(2): 115-125. doi:10.1006/fgbi.2000.1209
- Zwiers LH, Stergiopoulos I, Gielkens MM, Goodall SD, De Waard MA (2003) ABC Transporters of the Wheat Pathogen *Mycosphaerella graminicola* Function as Protectants against Biotic and Xenobiotic Toxic Compounds. *Molecular Genetics and Genomics* 269(4): 499-507. doi:10.1007/s00438-003-0855-x
- Zwiers LH, Stergiopoulos I, Van Nistelrooy JG, De Waard MA (2002) ABC Transporters and Azole Susceptibility in Laboratory Strains of the Wheat Pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46(12): 3900-3906. doi:10.1128/AAC.46.12.3900-3906.2002

8 Anhang

8.1 Ergänzende Abbildungen und Tabellen

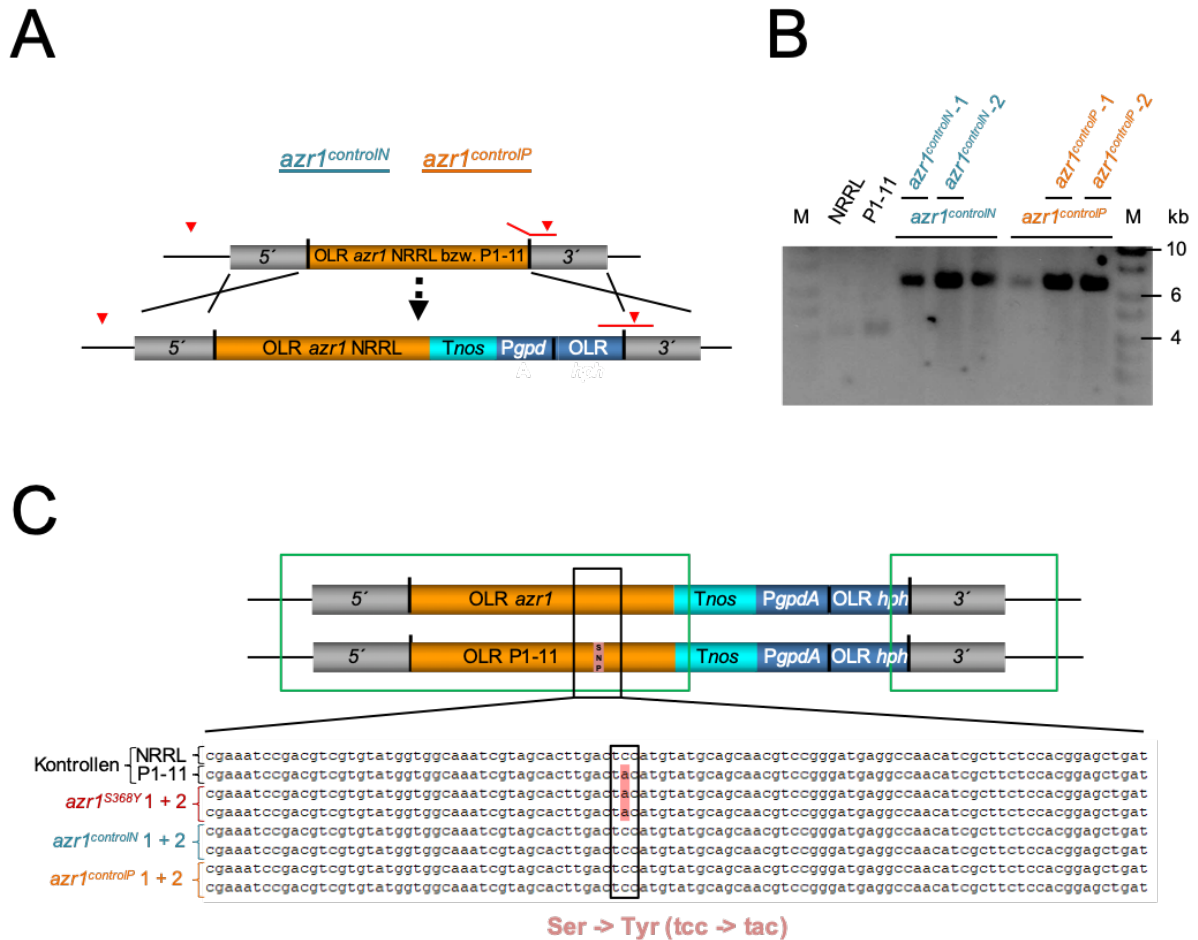


Abbildung E1: Erzeugung und Überprüfung der transgenen Pilzisolats.

- (A) Schematische Darstellung der für die Transformationen verwendeten Konstrukte. Die Integration der Konstrukte erfolgte über Doppelcrossover am dafür vorgesehen Wildtyplocus im *Fusarium graminearum* NRRL 13383 Genom. Rote Balken zeigen die Positionen, der in den Southern-Blots verwendeten Sonden an. Rote Pfeile symbolisieren die Restriktionsenzymststellen des Enzyms *OiiI*. Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu.
- (B) Southern-Blots der mit *OiiI* verdauten genomischen DNAs des Wildtyps NRRL, P1-11, *azr1^{controlIN}* und *azr1^{controlIP}*. Transformanten mit der richtigen Integration weisen in beiden Fällen eine Bande von 6569 bp auf. Die für die weiteren Experimente ausgewählten Transformanten sind gekennzeichnet.
- (C) Überprüfung der *azr1^{controlIN}* und *azr1^{controlIP}* Transformaten mittels Sanger-Sequenzierung. Die grün markierten Boxen kennzeichnen die überprüften Sequenzbereiche. Die rote Box kennzeichnet zudem die Position des entscheidenden Einzelnukleotid-Polymorphismus.

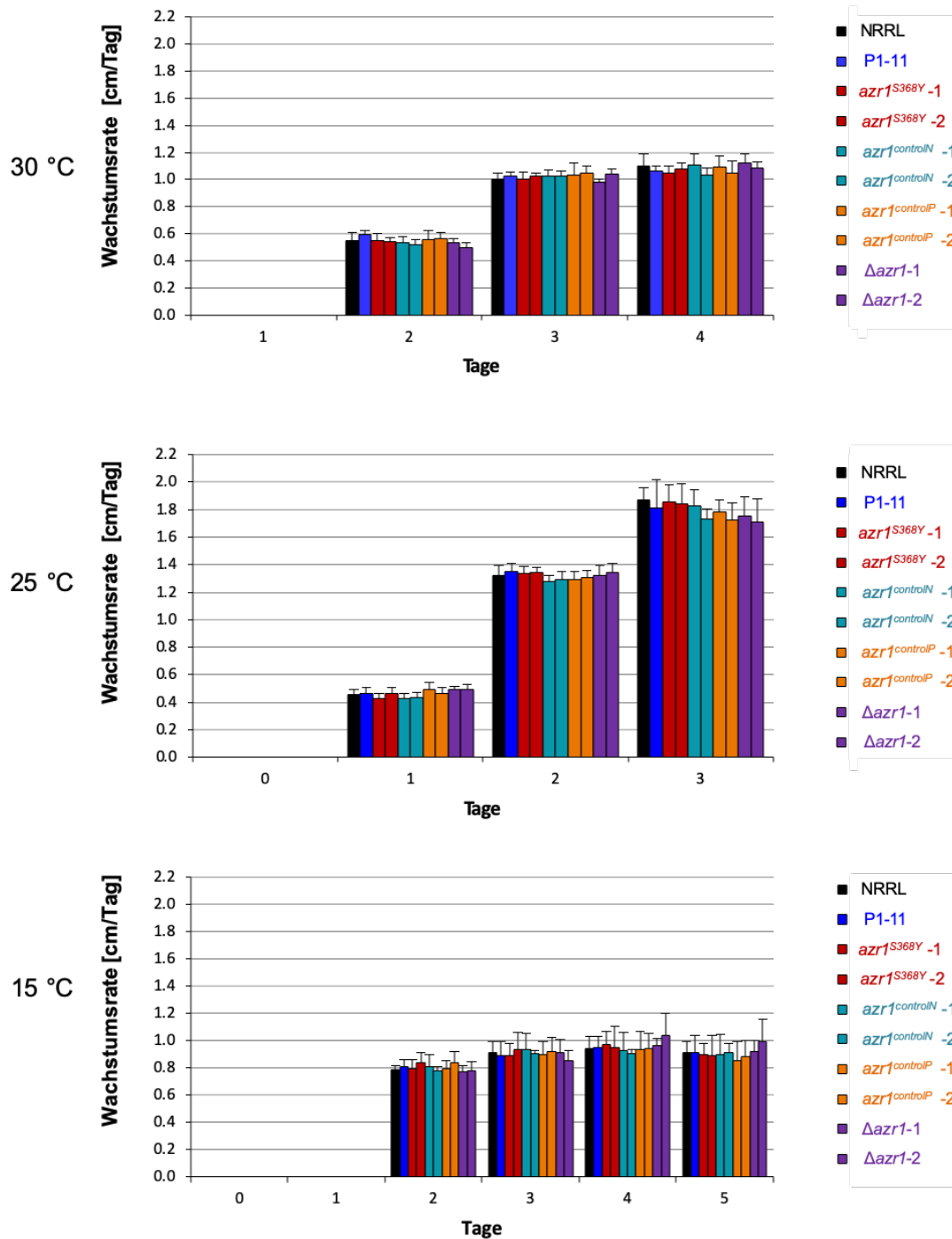


Abbildung E2: Unterschiedliche Inkubationstemperaturen beeinflussen die Wachstumsraten von Wildtyp und Mutanten in gleichem Maße.

Die Säulen repräsentieren den durchschnittlichen täglichen radialen Zuwachs des Myzels in cm pro Tag von Wildtyp, P1-11, *azr1^{S368Y}*, *azr1^{controlN}*, *azr1^{controlP}* und Δ *azr1* Mutanten im Vergleich auf PDA bei 15, 25 und 30 °C. Die Fehlerbalken basieren auf der SD. Student's t-test, $p < 0,05$.

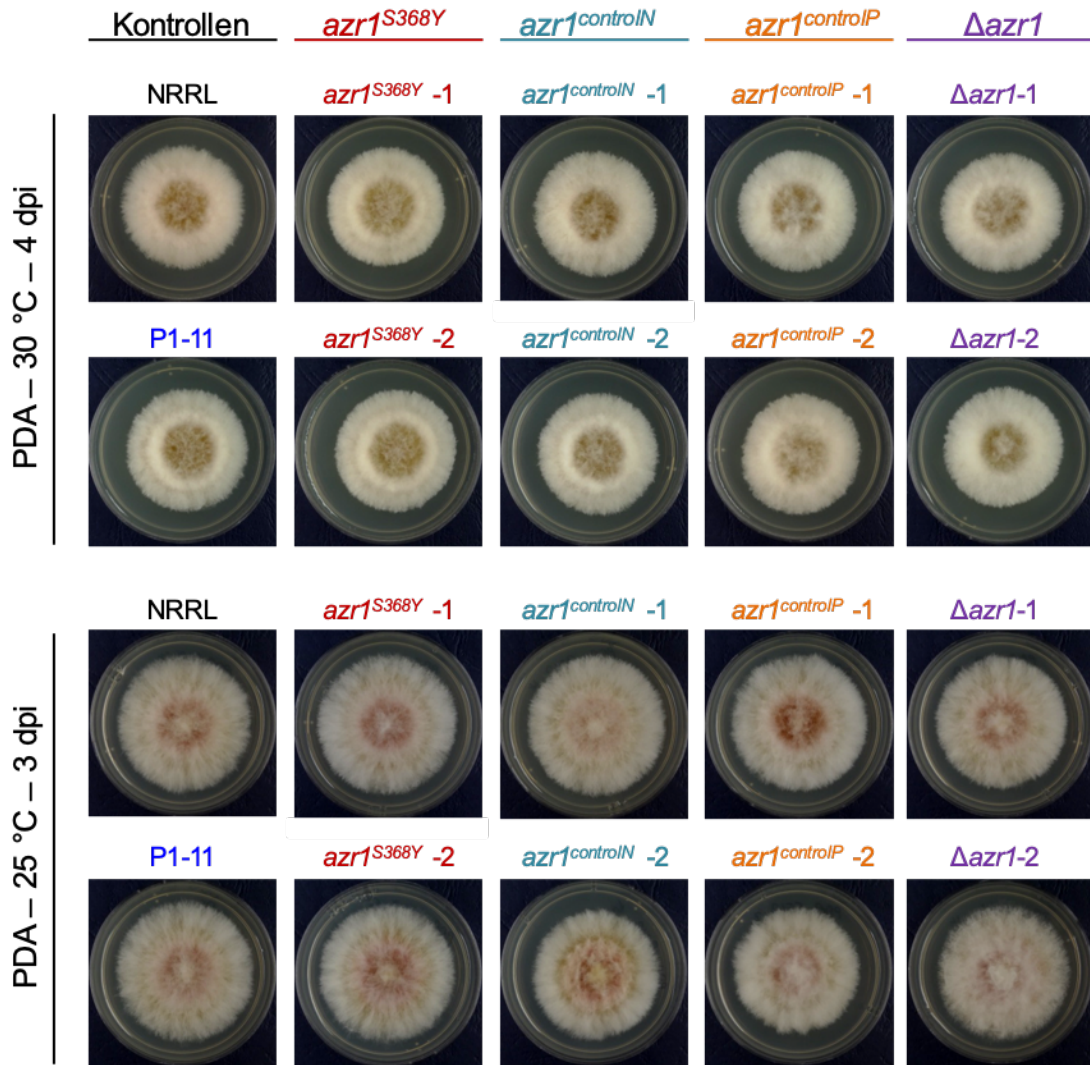


Abbildung E3: Unterschiedliche Inkubationstemperaturen beeinflussen die Koloniemorphologie von Wildtyp und Mutanten in gleichem Maße.

Die Fotos zeigen die Koloniemorphologie sowie das Gesamtwachstum von Wildtyp, P1-11, *azr1^{S368Y}*, *azr1^{controlN}*, *azr1^{controlP}* und Δ *azr1* Mutanten auf PDA bei 25 °C nach 3 Tagen bzw. bei 30 °C nach 4 Tagen.

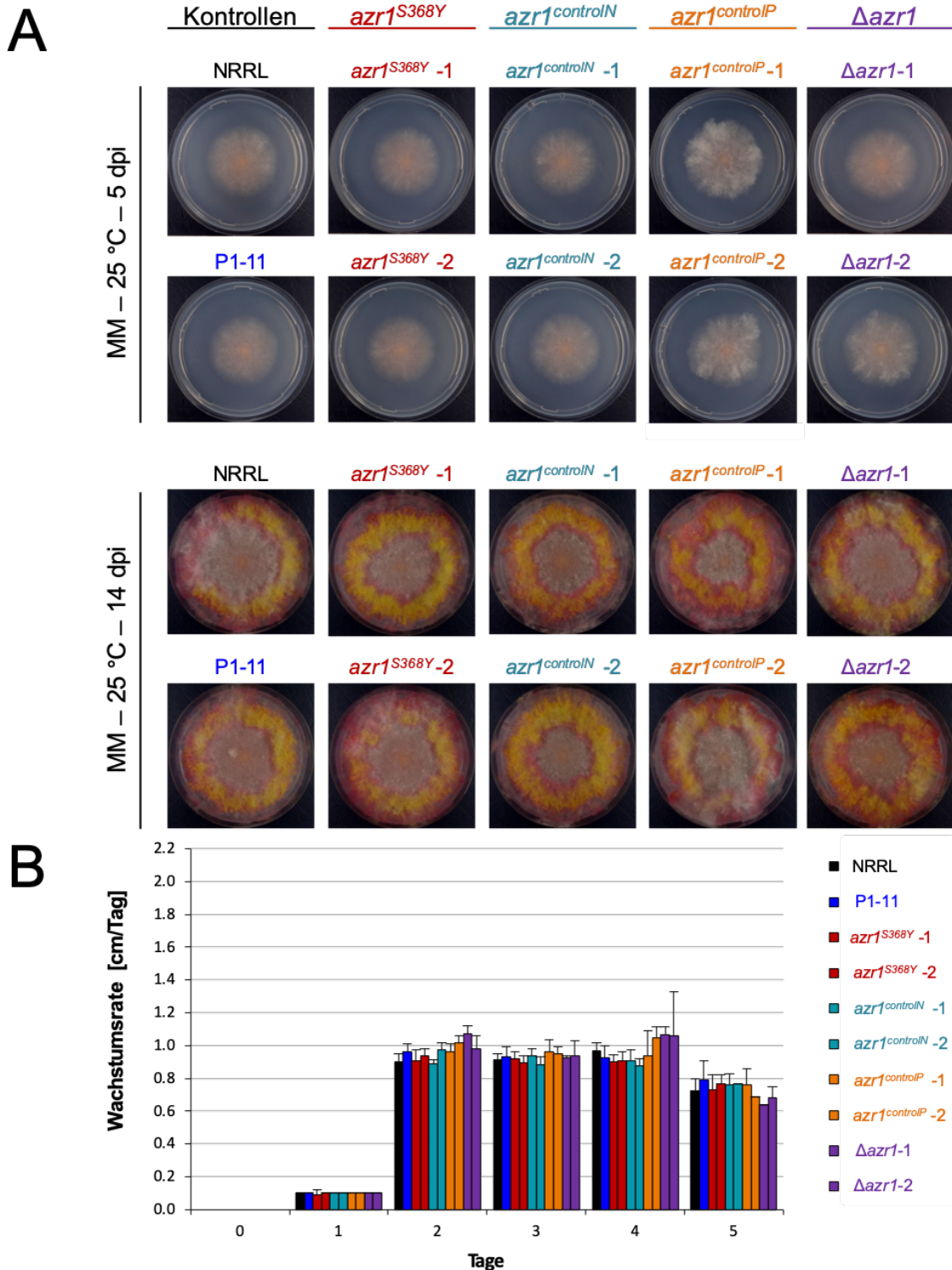


Abbildung E4: Auf MMA zeigen die Referenzstämme und die Mutanten keine Unterschiede in der Koloniemorphologie und der Wachstumsrate.

- (A) Die Fotos zeigen die Koloniemorphologie von Wildtyp, P1-11, *azr1^{S368Y}*, *azr1^{controlN}*, *azr1^{controlP}* und Δ *azr1* Mutanten auf MM bei 25 °C nach 5 bzw. 14 Tagen.
- (B) Die Säulen repräsentieren den durchschnittlichen täglichen radialen Zuwachs des Myzels in cm pro Tag von Wildtyp, P1-11, *azr1^{S368Y}*, *azr1^{controlN}*, *azr1^{controlP}* und Δ *azr1* Mutanten auf MMA bei 25 °C. Die Daten wurden über 5 Tage hinweg aufgenommen. Die Fehlerbalken basieren auf der SD. Student's t-test, $p < 0,05$.

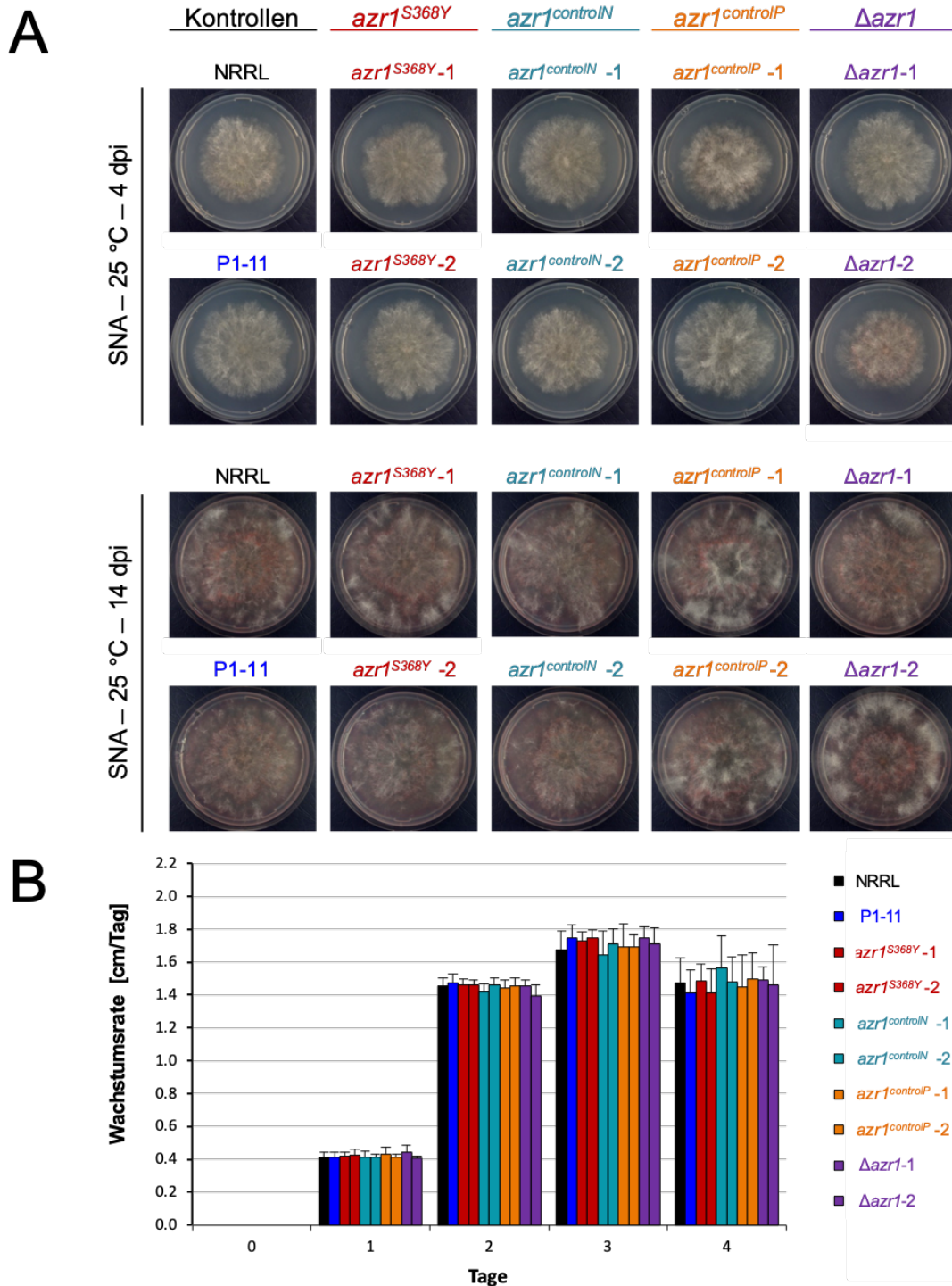


Abbildung E5: Auf SNA zeigen die Referenzstämme und die Mutanten keine Unterschiede in der Kolonimorphologie und der Wachstumsrate.

- (A) Die Fotos repräsentieren die Kolonimorphologie von Wildtyp, P1-11, *azr1^{S368Y}*, *azr1^{controlN}*, *azr1^{controlP}* und Δ *azr1* Mutanten auf SNA bei 25 °C nach 4 bzw. 14 Tagen.
- (B) Die Säulen repräsentieren den durchschnittlichen täglichen radialen Zuwachs des Myzels in cm pro Tag von Wildtyp, P1-11, *azr1^{S368Y}*, *azr1^{controlN}*, *azr1^{controlP}* und Δ *azr1* Mutanten auf MMA bei 25 °C. Die Daten wurden über 4 Tage hinweg aufgenommen. Die Fehlerbalken basieren auf der SD. Student's t-test, $p < 0,05$.

A



B

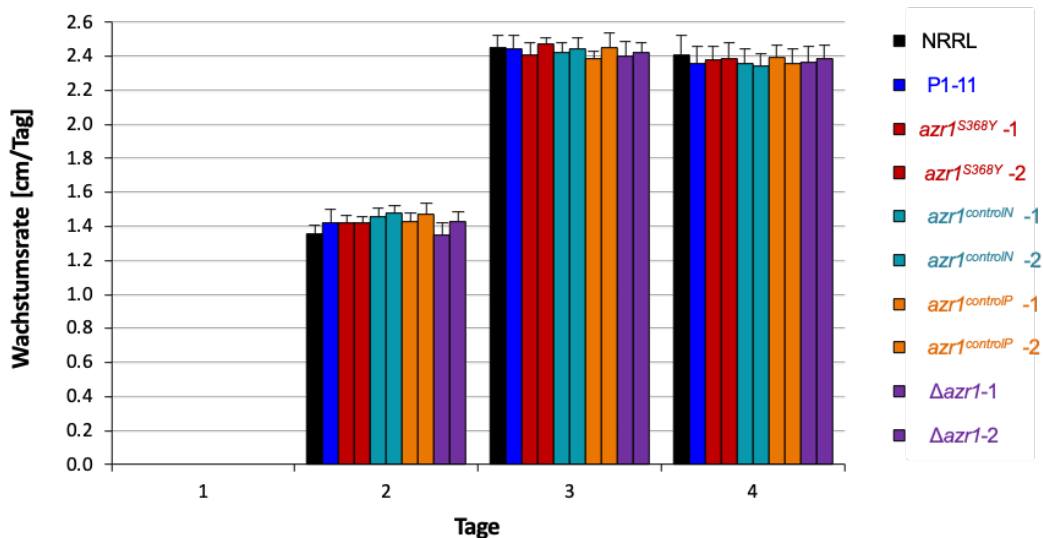


Abbildung E6: Auf Karotten-Agar zeigen die Referenzstämme und die Mutanten keine Unterschiede in der Koloniemorphologie und der Wachstumsrate.

- (A) Die Fotos repräsentieren die Koloniemorphologie von Wildtyp, P1-11, *azr1^{S368Y}*, *azr1^{controlN}*, *azr1^{controlP}* und Δ *azr1* Mutanten auf KM bei 25 °C nach 4 Tagen.
- (B) Die Säulen repräsentieren den durchschnittlichen täglichen radialen Zuwachs des Myzels in cm pro Tag von Wildtyp, P1-11, *azr1^{S368Y}*, *azr1^{controlN}*, *azr1^{controlP}* und Δ *azr1* Mutanten auf KM bei 25 °C. Die Daten wurden über 4 Tage hinweg aufgenommen. Die Fehlerbalken basieren auf der SD. Student's t-test, $p < 0,05$.

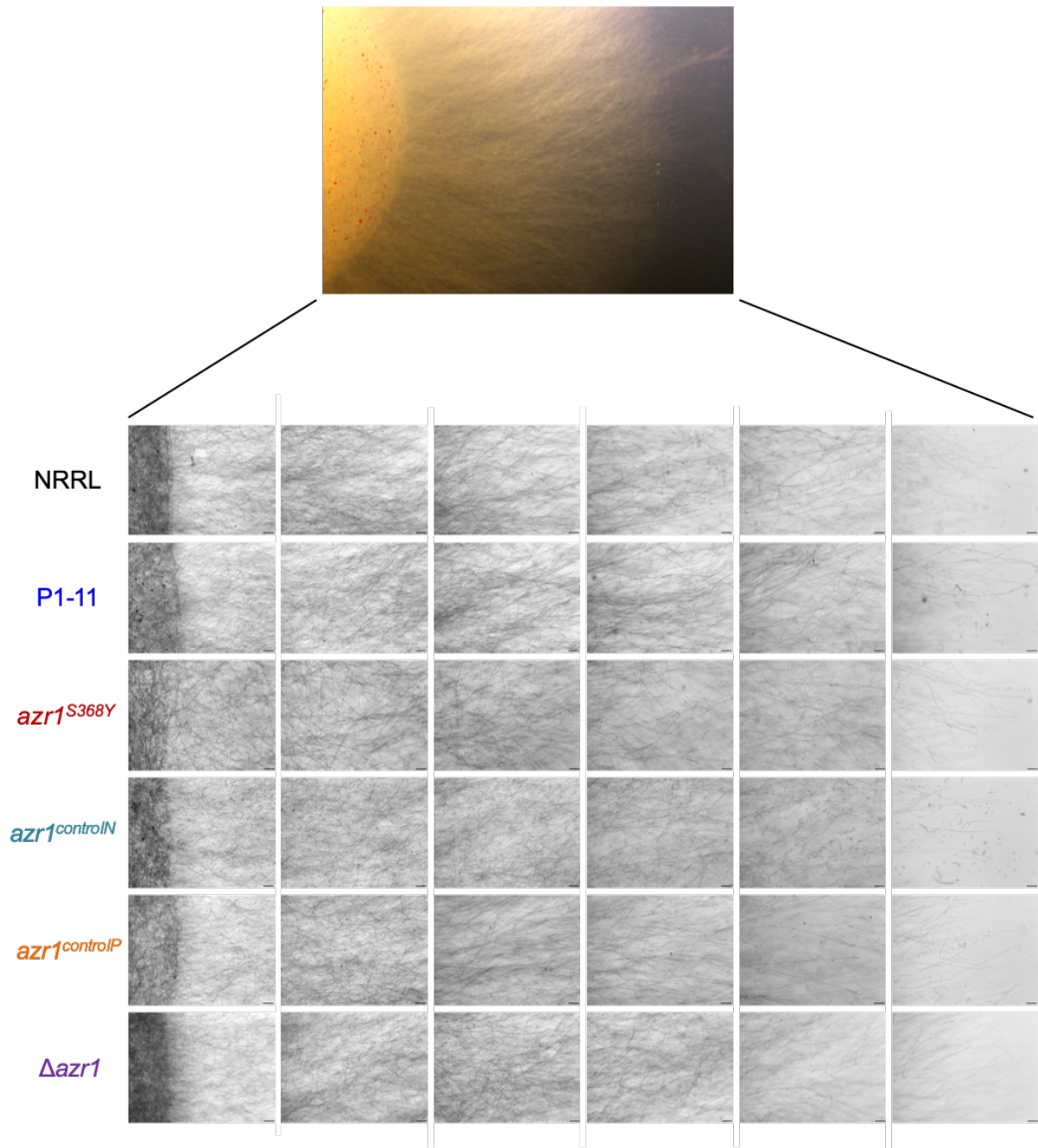


Abbildung E7: Die Hyphendichten des Wildtyps und der Mutanten unterscheiden sich in keiner der Zonen des Myzels.

Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen die unterschiedlichen Zonen des Hyphenwachstums von Wildtyp, P1-11, *azr1*^{S368Y}, *azr1*^{controlN}, *azr1*^{controlP} und Δ *azr1* Mutanten. Von links nach rechts nimmt das Alter der Hyphen ab. Für jedes Isolat wurde eine dünne Schicht PDA auf Objektträger gegossen und im Anschluss daran erfolgte die Inokulation dieser mit 1×10^6 Sporen/ml. Die Inkubation erfolgte bei 23 °C für 2 Tage. Hellfeldmikroskopie unter Verwendung einer 10fachen Vergrößerung. Maßstab 100 μ m.

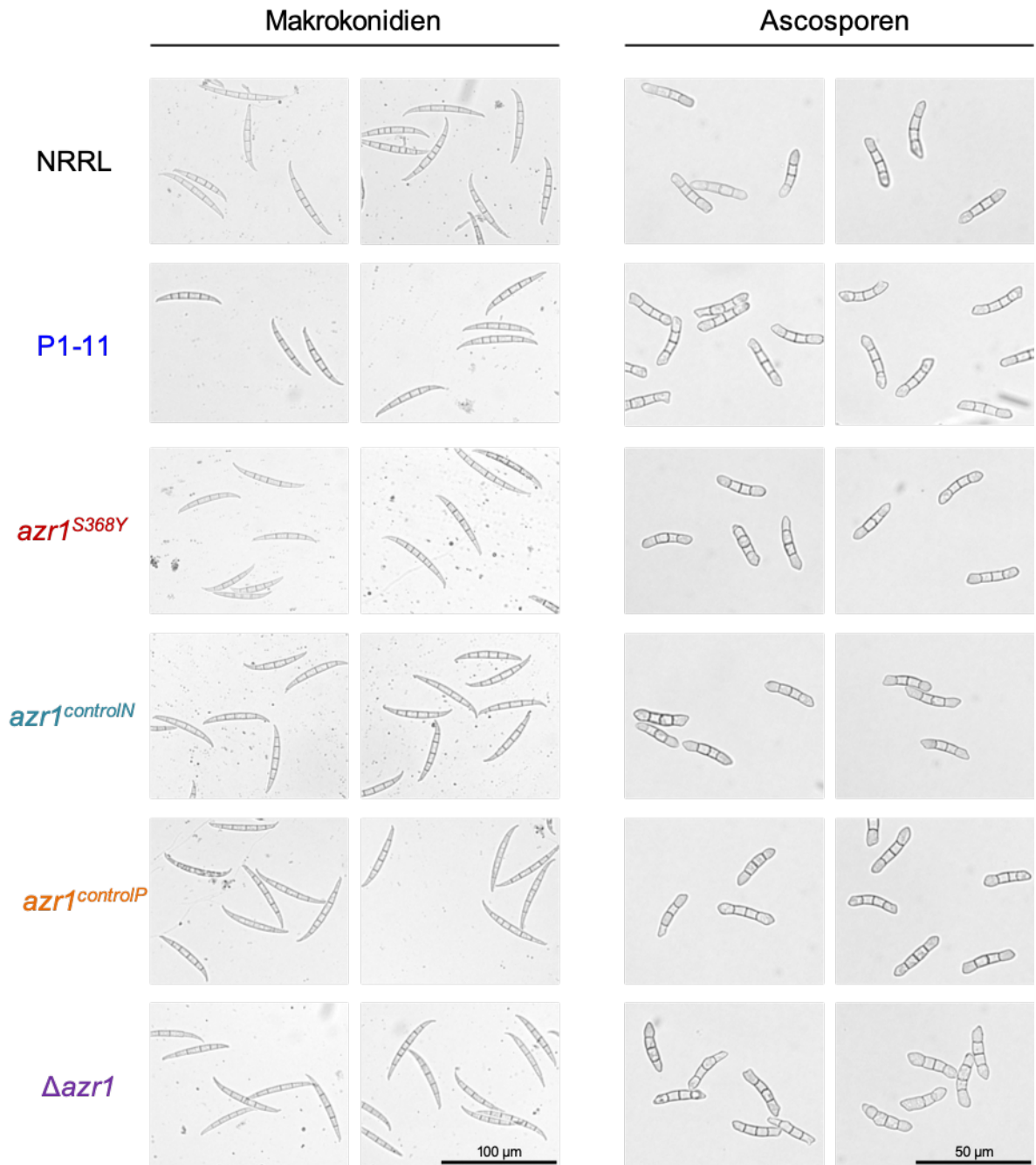


Abbildung E8: Die Morphologie von Makrokonidien und Ascosporen ist in den Mutanten nicht beeinträchtigt. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen die asexuell gebildeten Makrokonidien und sexuell gebildeten Ascosporen von Wildtyp, P1-11, *azr1*^{S368Y}, *azr1*^{controlN}, *azr1*^{controlP} und Δ *azr1* Mutanten. Die Aufnahmen erlauben die Beurteilung von Länge, Form und Segmentierung. Maßstab 50 bzw. 100 μ m.

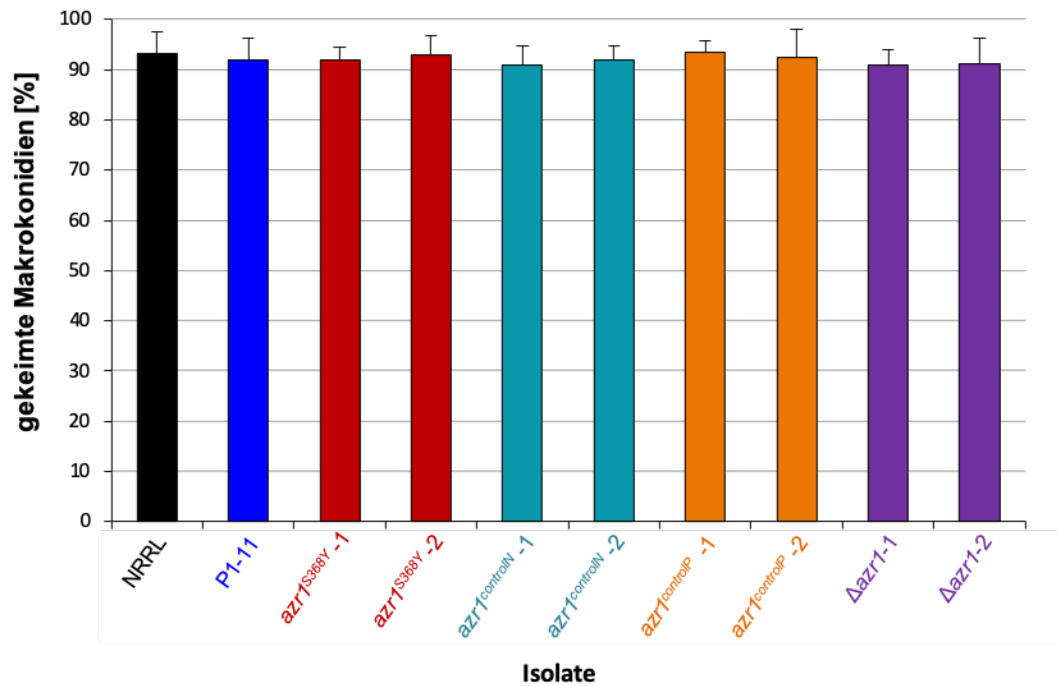


Abbildung E9: Die Makrokonidien der Referenzstäme und der Mutanten haben ähnliche Keimraten.

Die Säulen stellen die durchschnittliche Anzahl der gekeimten Makrokonidien von Wildtyp, P1-11, *azr1^{S368Y}*, *azr1^{controlN}*, *azr1^{controlP}* und Δ *azr1* Mutanten in Prozent dar. Die Fehlerbalken basieren auf der SD. Student's t-test, $p < 0,05$.

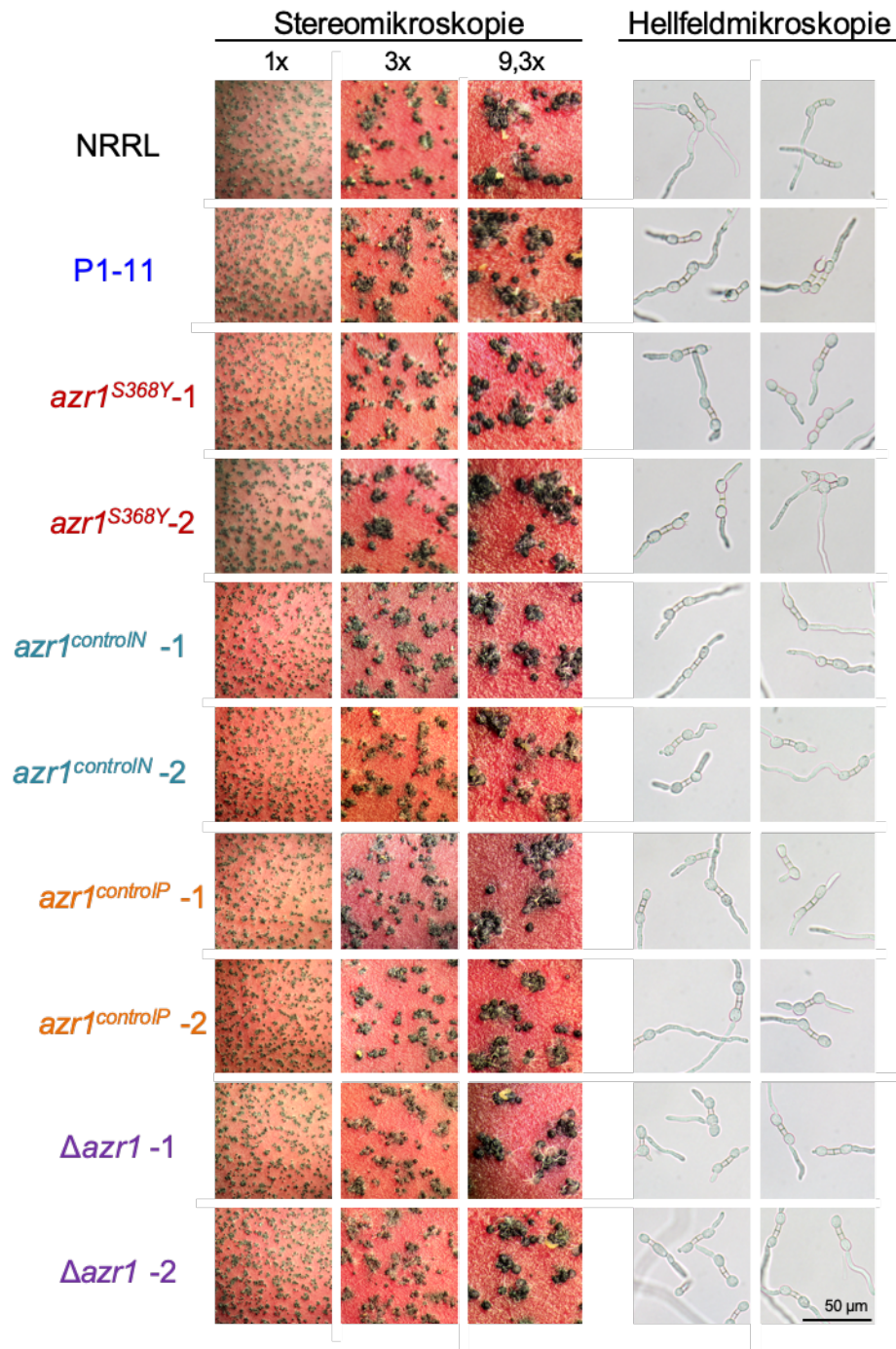


Abbildung E10: Alle Mutanten bilden Perithezien und keimfähige Ascosporen.

Auf der linken Seite zeigen die stereomikroskopischen Aufnahmen die Perithezien von Wildtyp, P1-11, *azr1*^{S368Y}, *azr1*^{controlN}, *azr1*^{controlP} und Δ *azr1* Mutanten auf Karotten-Agar in unterschiedlichen Vergrößerungen. Die Aufnahmen entstanden 14 Tage nach Inokulation mit einer 1fachen, 3fachen und 9,3fachen Vergrößerung. Auf der rechten Seite werden lichtmikroskopische Aufnahmen der Ascosporen von Wildtyp, P1-11, *azr1*^{S368Y}, *azr1*^{controlN}, *azr1*^{controlP} und Δ *azr1* Mutanten und deren erfolgreiche Keimung in PD-Medium gezeigt, 6 Stunden nach dem Hinzufügen zum Medium. Maßstab 50 µm.

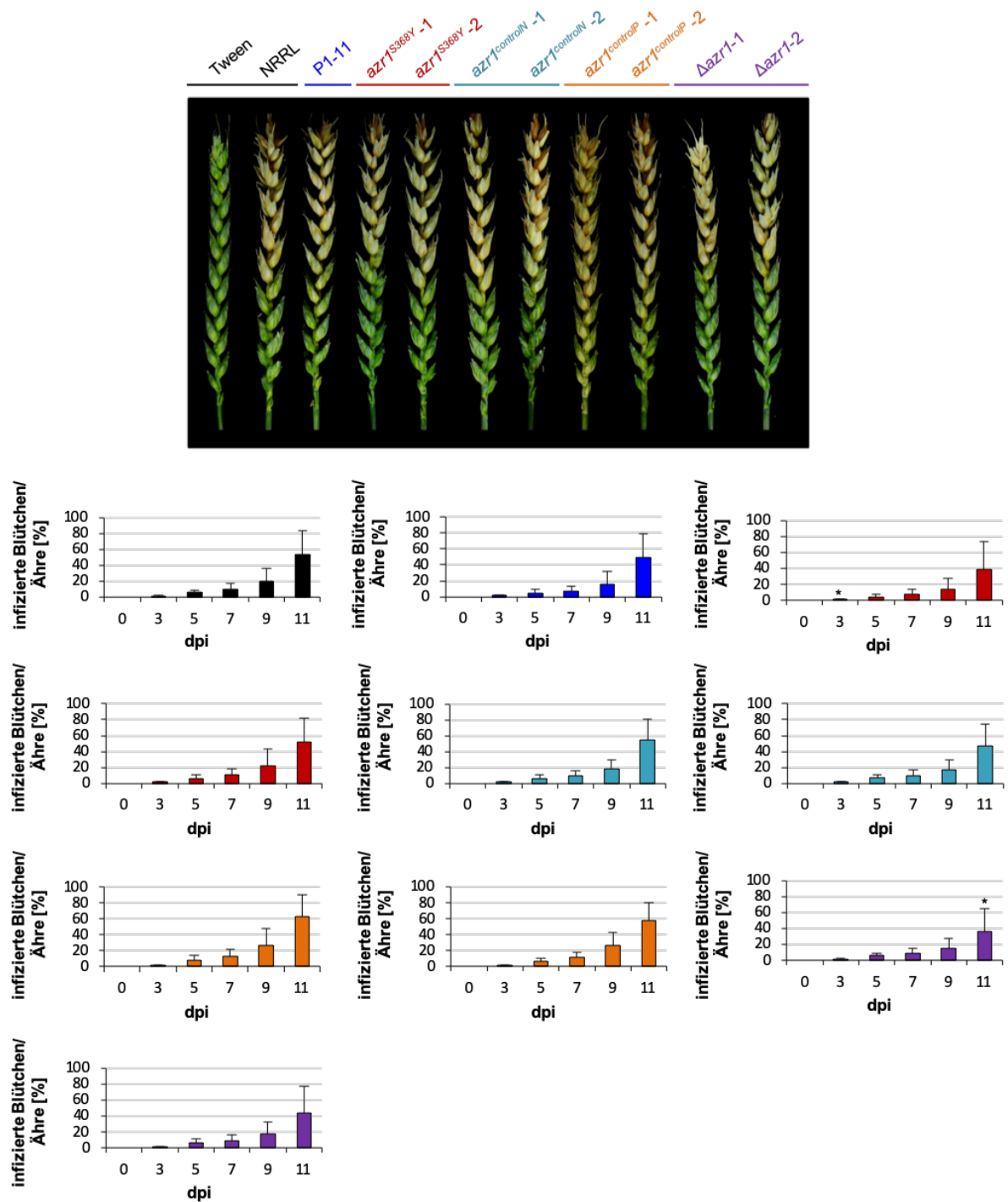


Abbildung E11: Die Virulenz an Weizenähren unterscheidet sich nicht zwischen Mutanten und Referenzstämmen.

Die Fotos zeigen repräsentativ infizierte Weizenähren von Wildtyp, P1-11, *azr1*^{S368Y}, *azr1*^{controlN}, *azr1*^{controlP} und Δ *azr1* Mutanten nach 11 dpi. Die Säulen repräsentieren die durchschnittliche relative Anzahl infizierter Blütchen pro Ähre von Wildtyp (schwarz), P1-11 (blau), *azr1*^{S368Y} (rot), *azr1*^{controlN} (petrol), *azr1*^{controlP} (orange) und Δ *azr1* Mutanten (violett). Die Fehlerbalken basieren auf der SD. Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zum Wildtyp an. Student's t-test, $p < 0,05$.

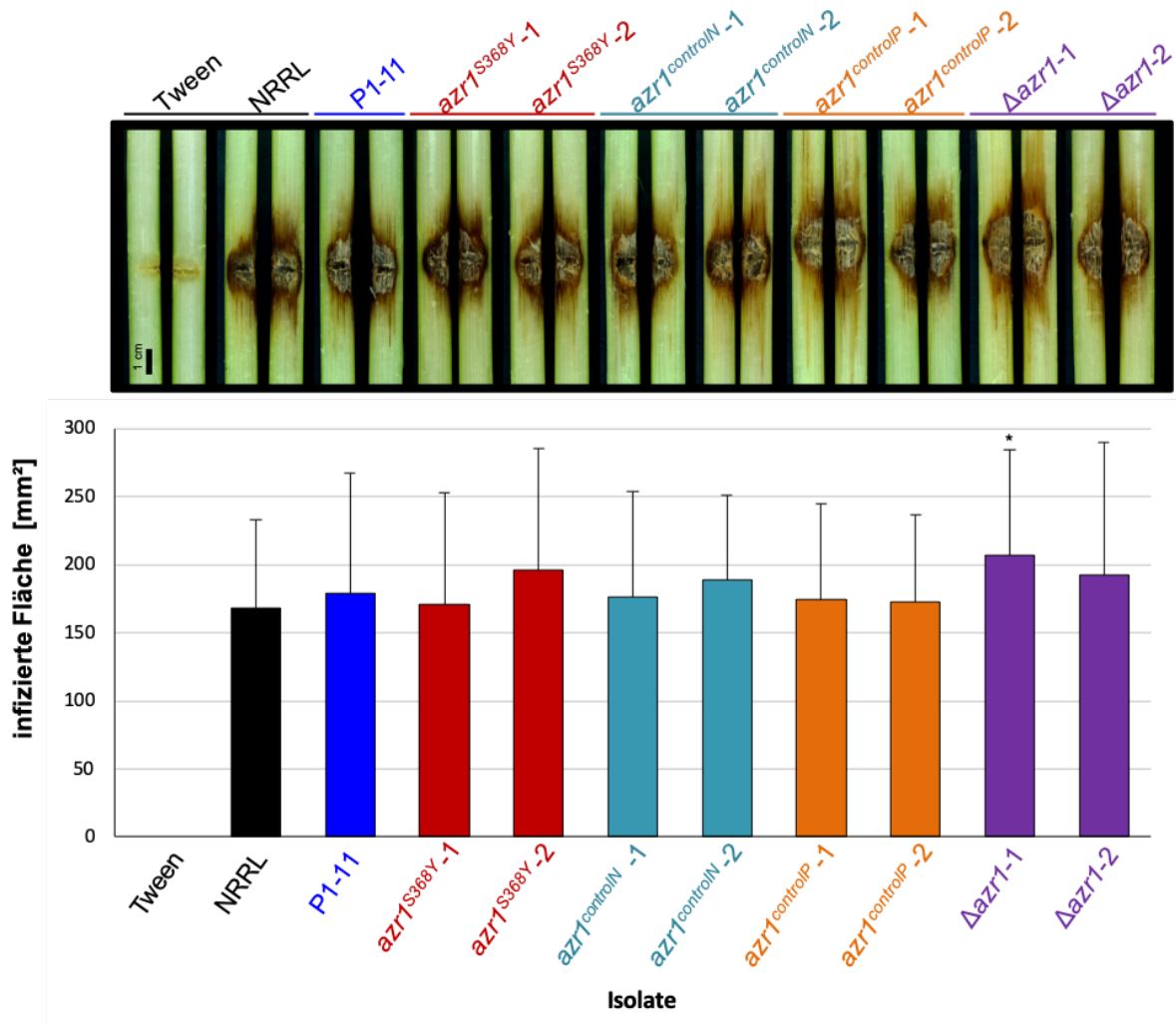
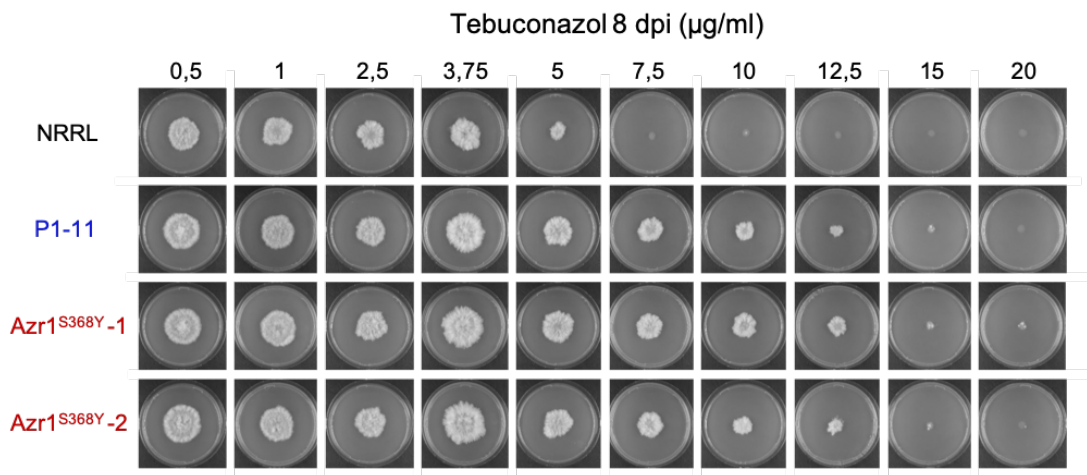


Abbildung E12: Die Virulenz an verwundeten Maisstängeln unterscheidet sich nicht zwischen Mutanten und Referenzstämmen.

Die Fotos zeigen repräsentativ kolonisierte Maisstängel von Wildtyp, P1-11, *azr1^{S368Y}*, *azr1^{controlIN}*, *azr1^{controlIP}* und $\Delta azr1$ Mutanten nach 10 dpi. Die Säulen stellen die durchschnittliche infizierte Fläche, hervorgerufen durch Wildtyp (schwarz), P1-11 (blau), *azr1^{S368Y}* (rot), *azr1^{controlIN}* (petrol), *azr1^{controlIP}* (orange) und $\Delta azr1$ Mutanten (violett) dar. Die Fehlerbalken basieren auf der SD. Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zum Wildtyp an. Student's t-test, $p < 0,05$.

A



B

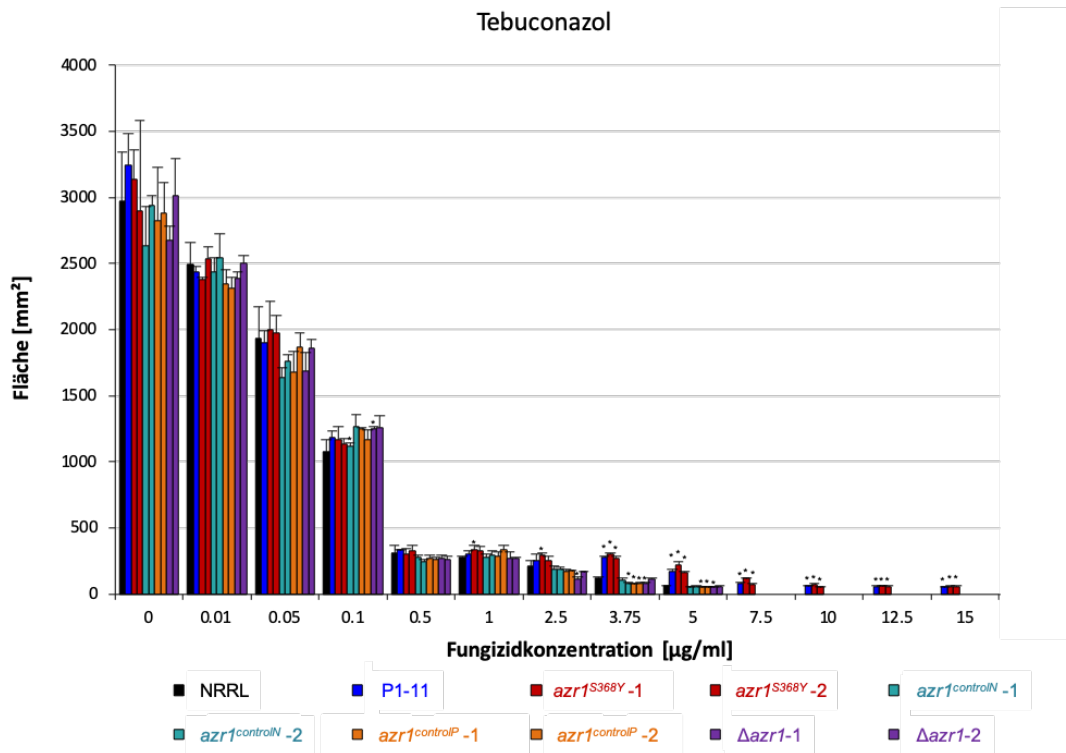
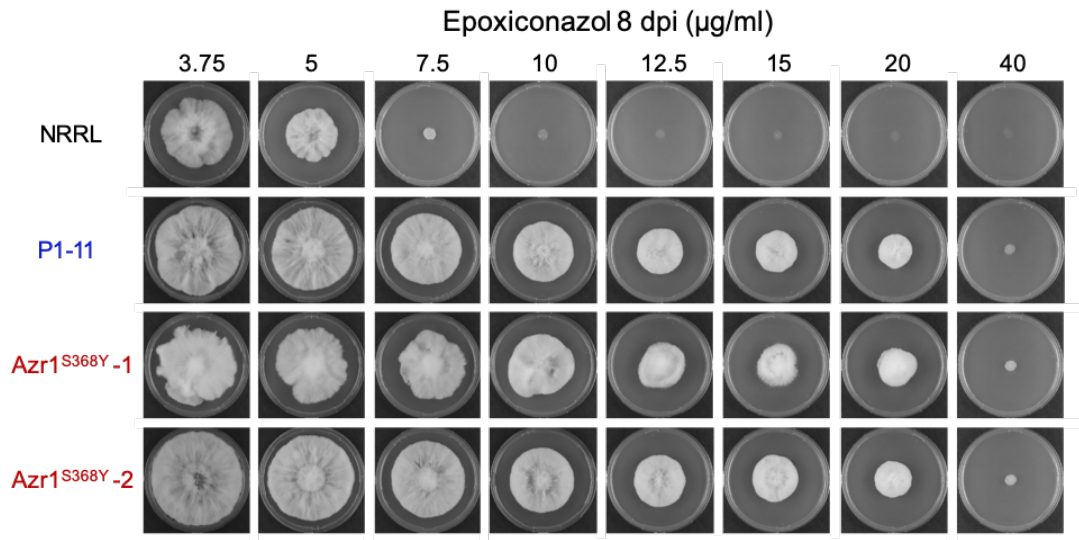


Abbildung E13: Die *azr1^{S368Y}* Mutanten tolerieren höhere Tebuconazolkonzentrationen als der Wildtyp.

- (A) Wachstum von Wildtyp, P1-11 und *azr1^{S368Y}* Mutanten auf PDA mit, von links nach rechts, steigenden Tebuconazolkonzentrationen. Die Aufnahmen entstanden nach 8 dpi.
- (B) Die Säulen repräsentieren das durchschnittliche flächige Wachstum von Wildtyp, P1-11, *azr1^{S368Y}*, *azr1^{controlN}*, *azr1^{controlP}* und Δ *azr1* Mutanten auf PDA mit steigenden Tebuconazolkonzentrationen nach 4 dpi. Die Fehlerbalken basieren auf der SD. Student's t-test, $p < 0,05$. Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zum Wildtyp an.

A



B

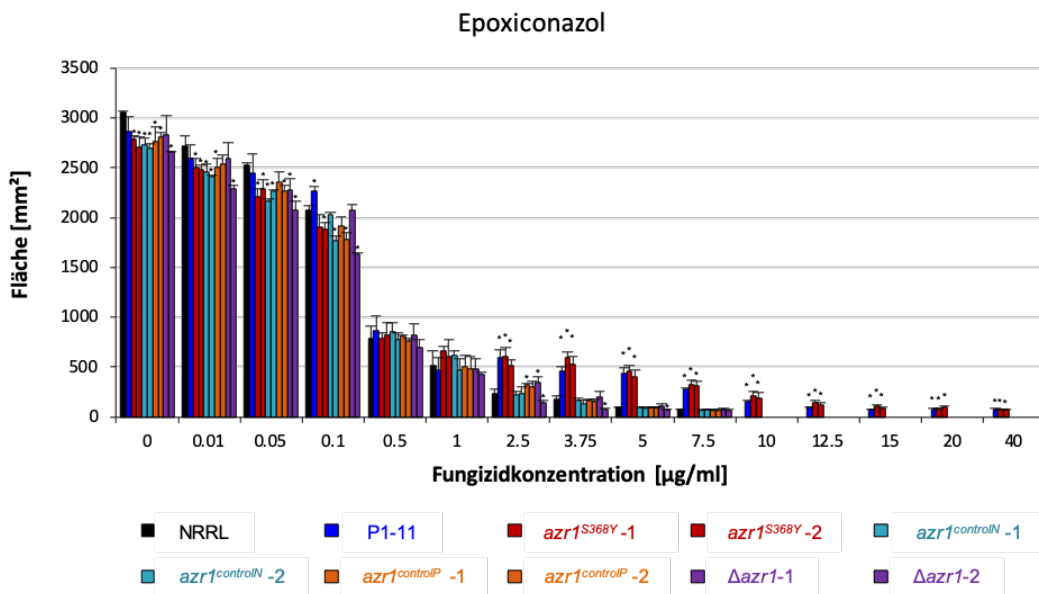


Abbildung E14: Die *azr1*^{S368Y} Mutanten tolerieren höhere Epoxiconazolkonzentrationen als der Wildtyp

- (A) Wachstum von Wildtyp, P1-11 und *azr1*^{S368Y} Mutanten auf PDA-Platten mit, von links nach rechts, steigenden Epoxiconazolkonzentrationen. Die Aufnahmen entstanden nach 8 dpi.
- (B) Die Säulen repräsentieren das durchschnittliche flächige Wachstum von Wildtyp, P1-11, *azr1*^{S368Y}, *azr1*^{controlN}, *azr1*^{controlP} und Δ *azr1* Mutanten auf PDA-Platten mit steigenden Epoxiconazolkonzentrationen nach 4 dpi. Die Fehlerbalken basieren auf der SD. Student's t-test, $p < 0,05$. Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zum Wildtyp an.

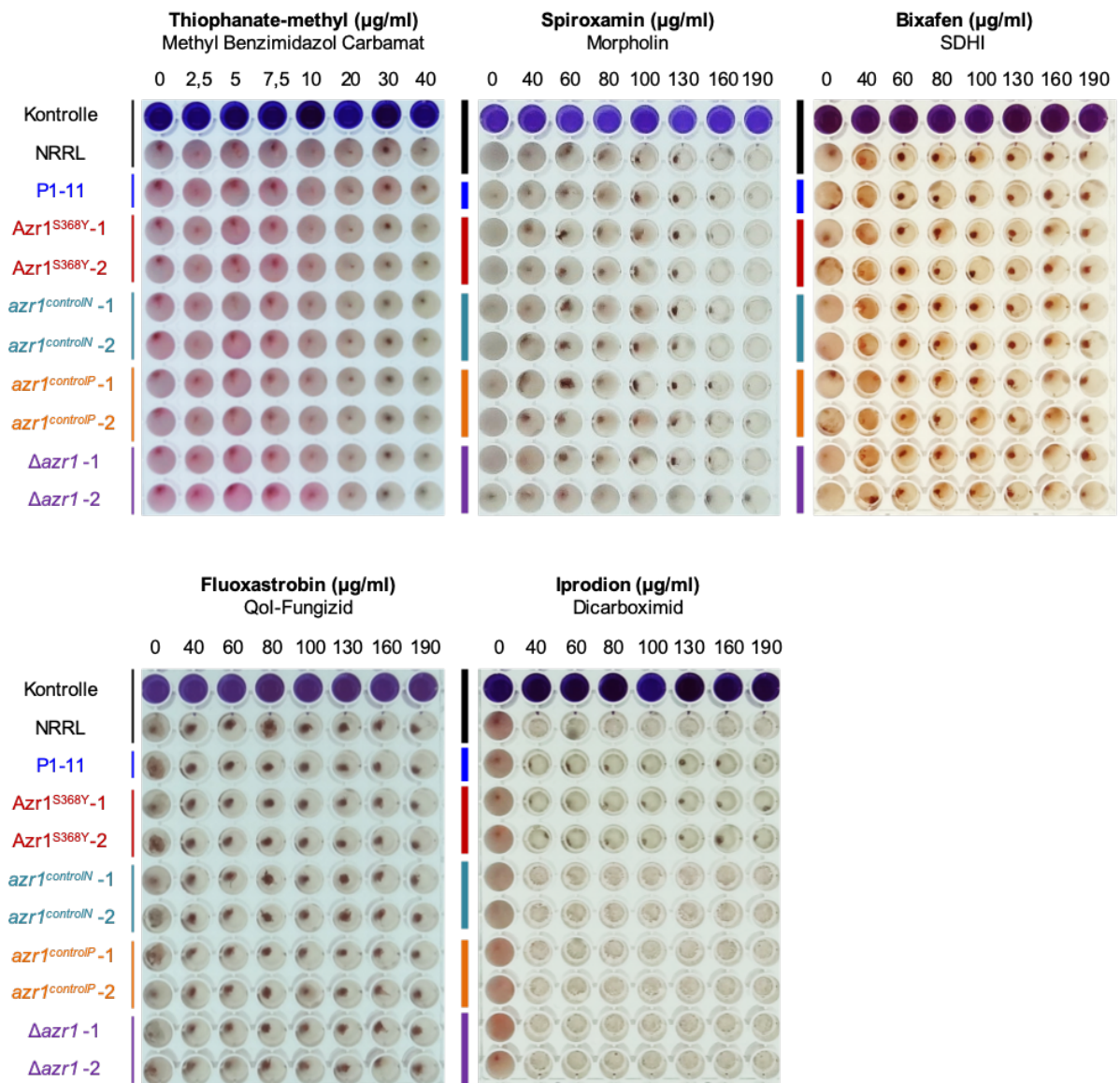


Abbildung E15: Fungizide mit anderen molekularen Wirkorten als dem der DMI-Fungizide inhibieren weder die Referenzstämme noch die Mutanten.

Die Fotos zeigen das Ergebnis der Resazurintests von Wildtyp, P1-11, *azr1^{S368Y}*, *azr1^{controlN}*, *azr1^{controlP}* und Δ *azr1* Mutanten nach 4 dpi. Es wurden Fungizide aus fünf FRAC-Klassen getestet. Die ausgewählten Konzentrationsbereiche wurden für jedes der Azol-Fungizide im Rahmen von Vorversuchen ermittelt. Die Wirkstoffkonzentration nimmt von links nach rechts zu. Die jeweils höchste Konzentration stellt die Löslichkeitsgrenze dar.

Tabelle E 1: Liste aller DEGs der *azr1*^{S368Y} Mutanten unter Anwendung eines log2FC von ≥ 1.

In der Tabelle sind die Gen ID, die EnsemblFungi- sowie die Interpro-Beschreibung, der Genname, sowie wenn vorhanden die Cluster ID und das Vorkommen von TMD aufgelistet. Zudem sind die log2FC Werte aller relevanten Vergleiche angegeben.

Anzahl dargestellter DEGs/Gesamtanzahl DEGs	Gen ID	EnsemblFungi Beschreibung	Interpro Beschreibung	Genname	Cluster_ID	TMhelix	<i>azr1</i> ^{S368Y} / <i>NRRL</i> log2FC				<i>azr1</i> ^{S368Y} / <i>azr1</i> ^{S368Y} -1 log2FC				<i>azr1</i> ^{S368Y} / <i>azr1</i> ^{S368Y} -2 log2FC			
							pAdj	log2FC	pAdj	log2FC	pAdj	log2FC	pAdj	log2FC	pAdj	log2FC	pAdj	log2FC
1/1	1 FGRAMPH1_01G04947	hypothetical protein																
2/2	1 FGRAMPH1_01G15627	hypothetical protein	ABC transporter-like		C16	TM-helix											1.75	0.00
	2 FGRAMPH1_01G25277	hypothetical protein	FAD/NAD(P)-binding domain superfamily														1.23	0.03
51/194 log2FC≥1	1 FGRAMPH1_01G15629	hypothetical protein	Zn(2)-C6 fungal-type DNA-binding domain	TF neben <i>ABC3</i>	C16		2.48	NA	5.30	0.00	4.59	0.00						
	2 FGRAMPH1_01G14465	cytochrome P450 51	Cytochrome P450	<i>ERG11</i>		TMhelix	0.60	0.30	4.21	0.00	3.96	0.00						
	3 FGRAMPH1_01G20829	hypothetical protein	Emopamil-binding protein			C65	TMhelix	0.69	0.27	2.79	0.00	2.66	0.00					
	4 FGRAMPH1_01G12519	hypothetical protein	Gfo/Idh/MocA-like oxidoreductase, N-terminal	Nachbarn von <i>AZR1</i>			0.62	0.28	1.84	0.00	2.92	0.00						
	5 FGRAMPH1_01G20967	hypothetical protein	Ankyrin repeat			C64		0.34	0.68	1.78	0.00	1.12	0.03					
	6 FGRAMPH1_01G03179	hypothetical protein	Cytochrome P450					0.54	NA	1.65	0.00	1.52	0.00					
	7 FGRAMPH1_01G22077	hypothetical protein	Immunoglobulin E-set					0.81	NA	1.57	0.00	1.10	0.04					
	8 FGRAMPH1_01G04879	hypothetical protein	Tail specific protease					0.76	0.25	1.57	0.00	1.47	0.00					
	9 FGRAMPH1_01G14101	hypothetical protein	Heterokaryon incompatibility				TMhelix	0.84	0.09	1.53	0.00	1.27	0.00					
	10 FGRAMPH1_01G05775	hypothetical protein					TMhelix	0.47	0.47	1.42	0.01	1.36	0.00					
	11 FGRAMPH1_01G17409	hypothetical protein						0.87	0.10	1.41	0.00	1.03	0.00					
	12 FGRAMPH1_01G00349	hypothetical protein	Glycosyl transferase CAP10 domain			C04	TMhelix	0.53	0.48	1.39	0.00	1.17	0.00					
	13 FGRAMPH1_01G16541	hypothetical protein	Oligopeptide transporter, OPT superfamily				TMhelix	0.77	0.20	1.39	0.00	1.19	0.00					
	14 FGRAMPH1_01G11433	hypothetical protein	Proton-dependent oligopeptide transporter family				TMhelix	1.07	0.06	1.38	0.00	1.73	0.00					
	15 FGRAMPH1_01G17261	hypothetical protein	von Willebrand factor, type A					0.93	0.05	1.37	0.00	1.24	0.00					
	16 FGRAMPH1_01G00105	hypothetical protein	Peptidase M43, pregnancy-associated plasma-A					0.47	0.52	1.35	0.00	1.06	0.02					
	17 FGRAMPH1_01G17967	hypothetical protein						0.48	0.46	1.32	0.00	1.11	0.00					
	18 FGRAMPH1_01G22131	hypothetical protein					TMhelix	0.54	0.46	1.32	0.01	1.68	0.00					
	19 FGRAMPH1_01G18085	hypothetical protein	Sirtuin family					0.44	0.48	1.31	0.00	1.01	0.00					
	20 FGRAMPH1_01G05861	hypothetical protein						0.79	0.05	1.26	0.00	1.10	0.00					
	21 FGRAMPH1_01G05569	hypothetical protein	Major facilitator, sugar transporter-like			C13	TMhelix	0.50	0.56	1.23	0.03	1.17	0.03					
	22 FGRAMPH1_01G24145	NADP-specific glutamate dehydrogenase	Glutamate/phenylalanine/leucine/valine dehydrogenase					0.58	0.42	1.23	0.00	1.24	0.00					
	23 FGRAMPH1_01G05153	hypothetical protein	ABC transporter-like, ATP-binding domain			C10	TMhelix	0.31	0.76	1.19	0.05	1.24	0.00					
	24 FGRAMPH1_01G25857	hypothetical protein	Peptidase M14, carboxypeptidase A					0.77	0.20	1.16	0.00	1.08	0.02					

Anzahl dargestellter DEGs/Gesamtanzahl DEGs		Gen ID	EnsembFungi Beschreibung	Interpro Beschreibung	Genname	Cluster_ID	TMhelix	log2FC						log2FC					
								NRR1	NRR2	NRR3	NRR4	NRR5	NRR6	NRR7	NRR8	NRR9	NRR10	NRR11	NRR12
25	FGRAMPH1_01G18933	hypothetical protein	Amino acid/polyamine transporter I				TMhelix	0.66	0.22	1.13	0.02	1.01	0.01						
26	FGRAMPH1_01G17515	uracil permease	Purine-cytosine permease				TMhelix	0.76	0.12	1.12	0.01	1.12	0.00						
27	FGRAMPH1_01G06449	hypothetical protein					TMhelix	0.84	0.09	1.04	0.04	1.16	0.00						
28	FGRAMPH1_01G04077	dicarboxylic amino acid permease	Amino acid permease, conserved site			C06	TMhelix	0.87	0.10	1.01	0.04	1.01	0.01						
29	FGRAMPH1_01G01099	hypothetical protein						-0.38	0.51	-1.04	0.00	-1.09	0.00						
30	FGRAMPH1_01G26637	diphthine synthase	Tetrapyrrole methylase					-0.44	0.42	-1.07	0.02	-1.15	0.00						
31	FGRAMPH1_01G09669	hypothetical protein	RTA-like protein				TMhelix	-0.33	0.64	-1.08	0.03	-1.00	0.02						
32	FGRAMPH1_01G12063	hypothetical protein	Alpha/beta hydrolase fold-1					-0.66	0.25	-1.13	0.01	-1.12	0.00						
33	FGRAMPH1_01G21041	hypothetical protein	Peptidase family M49			C63		-0.86	0.09	-1.16	0.00	-1.00	0.00						
34	FGRAMPH1_01G13579	hypothetical protein	ABC transporter-like, ATP-binding domain			C22	TMhelix	-0.64	0.18	-1.18	0.00	-1.20	0.00						
35	FGRAMPH1_01G05601	hypothetical protein	Multicopper oxidase, type 1			C13	TMhelix	-0.57	0.45	-1.20	0.00	-1.73	0.00						
36	FGRAMPH1_01G25439	hypothetical protein	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR					-0.45	0.51	-1.20	0.03	-1.20	0.00						
37	FGRAMPH1_01G27931	hypothetical protein						-0.77	0.23	-1.25	0.00	-1.27	0.00						
38	FGRAMPH1_01G13125	hypothetical protein	NodB homology domain					-0.16	0.86	-1.30	0.03	-1.34	0.01						
39	FGRAMPH1_01G11449	hypothetical protein	Protein of unknown function DUF4267				TMhelix	-0.80	0.13	-1.30	0.01	-1.60	0.00						
40	FGRAMPH1_01G21037	hypothetical protein	Hydroxylase/desaturase AsaB-like			C63		-0.69	0.20	-1.33	0.00	-1.03	0.00						
41	FGRAMPH1_01G13547	hypothetical protein	NmrA-like domain					-0.44	0.50	-1.38	0.00	-1.11	0.00						
42	FGRAMPH1_01G15725	hypothetical protein						-0.49	0.45	-1.46	0.00	-1.16	0.00						
43	FGRAMPH1_01G13867	hypothetical protein	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR					-0.75	0.17	-1.51	0.00	-1.03	0.03						
44	FGRAMPH1_01G13581	hypothetical protein	AMP-dependent synthetase/ligase			C22		-0.72	0.18	-1.57	0.00	-1.43	0.00						
45	FGRAMPH1_01G13209	hypothetical protein	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR					-0.14	0.90	-1.58	0.00	-1.46	0.00						
46	FGRAMPH1_01G14149	hypothetical protein	EGF-like domain			C18		-0.90	0.12	-1.66	0.00	-1.51	0.00						
47	FGRAMPH1_01G16217	hypothetical protein	Antifungal protein					-0.52	0.43	-1.77	0.00	-1.87	0.00						
48	FGRAMPH1_01G05597	hypothetical protein	O-methyltransferase domain			C13		-0.66	0.39	-1.89	0.00	-2.23	0.00						
49	FGRAMPH1_01G05595	hypothetical protein	EthD domain			C13		-0.77	0.27	-2.06	0.00	-2.25	0.00						
50	FGRAMPH1_01G05599	hypothetical protein	Flavin monooxygenase FMO			C13		-0.96	0.10	-2.12	0.00	-2.54	0.00						
51	FGRAMPH1_01G05593	hypothetical protein	Thioesterase			C13		-0.63	0.43	-2.23	0.00	-2.41	0.00						

Anzahl dargestellter DEGs/ Gesamtanzahl DEGs		Gen ID	EnsemblFungi Beschreibung	Interpro Beschreibung	Genname	Cluster_ID	TMhelix	NRRL / NRRL log2FC		azz1 ⁵³⁶⁹⁷ -1 log2FC		azz1 ⁵³⁶⁹⁷ -2 log2FC		NRRL / azz1 ⁵³⁶⁹⁷ -1 log2FC		NRRL / azz1 ⁵³⁶⁹⁷ -2 log2FC	
								pAdjusted		pAdjusted		pAdjusted		pAdjusted		pAdjusted	
11/81 log2FC:1	1	FGRAMPH1_01G25277	hypothetical protein	FAD/NAD(P)-binding domain superfamily				4.55	0.00	6.76	0.00	5.98	0.00				
	2	FGRAMPH1_01G09633	ATP-binding cassette transporter	ABC transporter-like	PDR5		TMhelix	3.57	0.00	4.01	0.00	4.07	0.00				
	3	FGRAMPH1_01G18649	sterol 24-C-methyltransferase	Methyltransferase type 11	ERG6			2.54	0.00	3.62	0.00	6.85	0.00				
	4	FGRAMPH1_01G26375	hypothetical protein	Phycocyanin domain				2.52	0.00	1.52	0.00	1.48	0.00				
	5	FGRAMPH1_01G25691	hypothetical protein	AMP-dependent synthetase/ligase			C42	-1.10	0.03	-2.36	0.00	-2.00	0.00				
	6	FGRAMPH1_01G25697	hypothetical protein	Aspartic peptidase A1 family			C42	-1.14	0.04	-2.75	0.00	-2.12	0.00				
	7	FGRAMPH1_01G25693	hypothetical protein	Alpha/beta hydrolase fold-1			C42	-1.40	0.00	-2.43	0.00	-1.92	0.00				
	8	FGRAMPH1_01G25705	hypothetical protein	Cytochrome P450			C42	-1.45	0.00	-2.49	0.00	-1.97	0.00				
	9	FGRAMPH1_01G25695	hypothetical protein	Glutathione S-transferase, N-terminal			C42	-1.49	0.00	-3.07	0.00	-1.70	0.00				
	10	FGRAMPH1_01G25699	hypothetical protein	Serine hydrolase FSH			C42	-1.52	0.00	-2.71	0.00	-1.78	0.00				
	11	FGRAMPH1_01G25701	hypothetical protein	Tetracycline resistance protein/drug resistance transporter			C42	TMhelix	-1.74	0.00	-2.74	0.00	-2.12	0.00			

Anzahl dargestellter DEGs/ Gesamtanzahl DEGs		Gen ID	EnsemblFungi Beschreibung	Interpro Beschreibung	Genname	Cluster_ID	TMhelix	NRRI / NRRI	log2FC	pAdjusted	NRRI / Δ ozrd-1	log2FC	pAdjusted	NRRI / Δ ozrd-2	log2FC	pAdjusted	NRRI / Δ ozrd-3	log2FC	pAdjusted	
		31	FGRAMPH1_01G09031	hypothetical protein	NADP-dependent oxidoreductase domain															
		32	FGRAMPH1_01G05549	hypothetical protein	HpcH/HpaI aldolase/citrate lyase domain	C50						1.64	0.00	1.70	0.00					
		33	FGRAMPH1_01G08875	hypothetical protein	SKP1/BTB/POZ domain superfamily							1.63	0.00	1.69	0.00					
		34	FGRAMPH1_01G05835	hypothetical protein			TMhelix					1.62	0.01	2.00	0.00					
		35	FGRAMPH1_01G00051	hypothetical protein	Egh16-like virulence factor							1.60	0.01	2.14	0.00					
		36	FGRAMPH1_01G00599	hypothetical protein	Domain of unknown function DUF2235							1.58	0.01	2.97	0.00					
		37	FGRAMPH1_01G00581	hypothetical protein	Zinc-binding domain							1.57	0.01	3.89	0.00					
		38	FGRAMPH1_01G17625	hypothetical protein			TMhelix					1.57	0.01	1.97	0.00					
		39	FGRAMPH1_01G24669	hypothetical protein	Alkaline phosphatase							1.56	0.00	1.88	0.00					
		40	FGRAMPH1_01G16085	hypothetical protein	Acyl transferase domain superfamily							1.56	0.00	2.29	0.00					
		41	FGRAMPH1_01G21421	hypothetical protein	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase	C31						1.55	0.00	2.18	0.00					
		42	FGRAMPH1_01G16781	hypothetical protein	Cyanovirin-N							1.55	0.00	1.58	0.00					
		43	FGRAMPH1_01G12563	hypothetical protein	FAD linked oxidase, N-terminal							1.54	0.00	3.82	0.00					
		44	FGRAMPH1_01G05133	hypothetical protein								1.54	0.00	1.57	0.01					
		45	FGRAMPH1_01G12627	hypothetical protein	HAD superfamily							1.53	0.01	2.78	0.00					
		46	FGRAMPH1_01G10133	hypothetical protein	Rhamnose/fucose mutarotase							1.52	0.00	2.18	0.00					
		47	FGRAMPH1_01G06041	hypothetical protein								1.52	0.00	2.18	0.00					
		48	FGRAMPH1_01G18277	hypothetical protein	ABC transporter-like		TMhelix					1.51	0.00	1.79	0.00					
		49	FGRAMPH1_01G21963	hypothetical protein								-1.51	0.01	-1.68	0.00					
		50	FGRAMPH1_01G07455	hypothetical protein	Zinc finger, CCCH-type	C66						-1.55	0.00	-1.83	0.00					
		51	FGRAMPH1_01G02553	hypothetical protein	Carbohydrate kinase, thermoresistant glucokinase							-1.57	0.00	-2.64	0.00					
		52	FGRAMPH1_01G24145	NADP-specific glutamate dehydrogenase	Glutamate/phenylalanine/leucine/valine dehydrogenase							-1.62	0.00	-1.85	0.00					
		53	FGRAMPH1_01G12659	hypothetical protein	Major facilitator superfamily							-1.62	0.00	-1.62	0.00					
		54	FGRAMPH1_01G26007	hypothetical protein		C26	TMhelix					-1.64	0.00	-2.33	0.00					
		55	FGRAMPH1_01G02281	hypothetical protein								-1.66	0.00	-1.89	0.00					
		56	FGRAMPH1_01G22005	hypothetical protein	LDLR class B repeat							-1.66	0.01	-2.09	0.00					
		57	FGRAMPH1_01G06841	hypothetical protein								-1.68	0.00	-1.90	0.00					
		58	FGRAMPH1_01G09905	hypothetical protein								-1.69	0.00	-2.33	0.00					
		59	FGRAMPH1_01G04059	hypothetical protein								-1.70	0.01	-2.13	0.00					
		60	FGRAMPH1_01G16893	hypothetical protein	Zinc finger, RING/FYVE/PHD-type							-1.71	0.01	-1.60	0.01					
		61	FGRAMPH1_01G13767	hypothetical protein	Epoxide hydrolase-like							-1.73	0.00	-1.67	0.00					
												-1.74	0.00	-1.60	0.02					
												-1.76	0.00	-2.38	0.00					

Anzahl dargestellter DEGs/ Gesamtanzahl DEGs		Gen ID	EnsemblFungi Beschreibung	Interpro Beschreibung	Genname	Cluster_ID	TMhelix	NRRI / NRRI	log2FC	pAdjusted	NRRI / NRRI	log2FC	pAdjusted	NRRI / NRRI	log2FC	pAdjusted	NRRI / NRRI	log2FC	pAdjusted	NRRI / NRRI	log2FC	pAdjusted	
		62	FGRAMPH1_01G16897	hypothetical protein	Zinc finger, RING-type																		
		63	FGRAMPH1_01G16963	hypothetical protein	DapA-like																		
		64	FGRAMPH1_01G04119	hypothetical protein	Protein of unknown function DUF3659																		
		65	FGRAMPH1_01G27075	hypothetical protein	Pectin lyase fold/virulence factor																		
		66	FGRAMPH1_01G04105	hypothetical protein	Alcohol dehydrogenase, zinc-type, conserved site																		
		67	FGRAMPH1_01G14117	hypothetical protein	Mandelate racemase/muconate lactonizing enzyme, N-terminal domain																		
		68	FGRAMPH1_01G12925	hypothetical protein	Translation protein, beta-barrel domain superfamily																		
		69	FGRAMPH1_01G09795	hypothetical protein	NAD-dependent epimerase/dehydratase																		
		70	FGRAMPH1_01G20509	hypothetical protein	CidB/LrgB family																		
		71	FGRAMPH1_01G12759	hypothetical protein	Glycoside hydrolase, family 3, N-terminal																		
		72	FGRAMPH1_01G25671	hypothetical protein	Myc-type, basic helix-loop-helix (bHLH) domain																		
		73	FGRAMPH1_01G22339	hypothetical protein	Alpha/beta hydrolase fold-1		C37																
		74	FGRAMPH1_01G08879	hypothetical protein	Cellulose-binding domain, fungal																		
		75	FGRAMPH1_01G12219	hypothetical protein	Sugar/inositol transporter																		
		76	FGRAMPH1_01G26215	hypothetical protein	Ribonuclease H domain																		
		77	FGRAMPH1_01G09173	hypothetical protein	GroES-like superfamily																		
		78	FGRAMPH1_01G25273	hypothetical protein	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR																		
		79	FGRAMPH1_01G00221	hypothetical protein	Sugar/inositol transporter		C03																
		80	FGRAMPH1_01G19593	hypothetical protein																			
		81	FGRAMPH1_01G13937	hypothetical protein	Quinate/shikimate 5-dehydrogenase/glutamyl-tRNA reductase																		
		82	FGRAMPH1_01G15839	hypothetical protein	TauD/TfdA-like domain																		
		83	FGRAMPH1_01G20207	hypothetical protein	Glycoside hydrolase, family 61																		
		84	FGRAMPH1_01G11729	hypothetical protein	Acetate transporter GPR1/FUN34/SatP family																		
		85	FGRAMPH1_01G25887	hypothetical protein	Gamma-glutamylcyclotransferase, AIG2-like																		
		86	FGRAMPH1_01G12233	hypothetical protein	GroES-like superfamily																		
		87	FGRAMPH1_01G07609	hypothetical protein																			
		88	FGRAMPH1_01G05167	high-affinity methionine permease	Amino acid/polyamine transporter I																		
		89	FGRAMPH1_01G19095	hypothetical protein	Protein of unknown function DUF3433																		
		90	FGRAMPH1_01G11507	hypothetical protein																			
		91	FGRAMPH1_01G16237	hypothetical protein	NmrA-like domain																		

Anzahl dargelegter DEGs/ Gesamtanzahl DEGs	Gen ID	EnsemblFungi Beschreibung	Interpro Beschreibung	Genname	Cluster_ID	TMhelix	log2FC		log2FC		log2FC		log2FC		log2FC				
							NRRI / Δ azr1	pAdjusted	Δ azr1-1 / Δ azr1-1	pAdjusted	Δ azr1-2 / Δ azr1-2	pAdjusted	NRRI / Δ azr1-1	pAdjusted	NRRI / Δ azr1-2	pAdjusted			
85/382	1	FGRAMPH1_01G12519	hypothetical protein	Oxidoreductase, N-terminal	next to AZR1							6.29	0.00	4.43	0.00	6.01	0.00	4.10	0.00
log2FC: 1.5	2	FGRAMPH1_01G16217	hypothetical protein	Antifungal protein								4.66	0.00	9.94	0.00	3.00	0.00	8.89	0.00
	3	FGRAMPH1_01G16215	hypothetical protein									2.90	0.00	7.31	0.00	1.20	0.01	5.30	0.00
	4	FGRAMPH1_01G16989	hypothetical protein	Domain of unknown function DUF4149		TMhelix						2.81	0.00	2.79	0.00	1.35	0.01	1.91	0.00
	5	FGRAMPH1_01G25321	hypothetical protein	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase								2.74	0.00	2.50	0.00	1.39	0.00	1.47	0.00
	6	FGRAMPH1_01G04243	hypothetical protein	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase		C07						2.67	0.00	2.04	0.00	1.56	0.00	1.08	0.00
	7	FGRAMPH1_01G14193	hypothetical protein									2.42	0.00	1.76	0.01	1.61	0.00	1.29	0.05
	8	FGRAMPH1_01G08561	hypothetical protein									2.37	0.00	1.75	0.00	1.56	0.00	1.36	0.00
	9	FGRAMPH1_01G09119	hypothetical protein	Peptidase S8/S53 domain								2.33	0.00	2.70	0.00	2.15	0.00	2.07	0.00
	10	FGRAMPH1_01G18773	hypothetical protein	O-methyltransferase domain		C34						2.32	0.00	2.92	0.00	1.40	0.00	1.23	0.00
	11	FGRAMPH1_01G09063	hypothetical protein	NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase, N-terminal		C49						2.27	0.00	2.74	0.00	1.98	0.00	1.55	0.00
	12	FGRAMPH1_01G08369	hypothetical protein			C61						2.24	0.00	1.71	0.00	1.17	0.00	1.42	0.00
	13	FGRAMPH1_01G08103	hypothetical protein				TMhelix					2.22	0.00	2.32	0.00	1.49	0.00	2.48	0.00
	14	FGRAMPH1_01G12029	hypothetical protein	Cytochrome P450			TMhelix					2.21	0.00	1.80	0.00	2.04	0.00	2.06	0.00
	15	FGRAMPH1_01G24253	hypothetical protein	Interferon alpha-inducible protein IFI6/IFI27-like			TMhelix					2.07	0.00	2.40	0.00	1.21	0.00	1.56	0.00
	16	FGRAMPH1_01G05455	hypothetical protein	PLAC8 motif-containing protein								2.02	0.00	2.66	0.00	0.90	0.03	1.98	0.00
	17	FGRAMPH1_01G09387	hypothetical protein			C47						1.92	0.00	1.70	0.00	1.00	0.05	1.25	0.02
	18	FGRAMPH1_01G08529	hypothetical protein	FAD-binding domain		C62	TMhelix					1.84	0.00	2.02	0.00	1.61	0.00	2.86	0.00
	19	FGRAMPH1_01G13867	hypothetical protein	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR								1.75	0.00	1.62	0.00	0.94	0.00	0.92	0.01
	20	FGRAMPH1_01G09117	hypothetical protein	Peptidase S8/S53 domain								1.74	0.00	1.63	0.00	1.47	0.00	1.51	0.01
	21	FGRAMPH1_01G14727	hypothetical protein	Glutathione-dependent formaldehyde-activating enzyme/centromere								1.72	0.00	2.09	0.00	1.06	0.00	1.92	0.00
	22	FGRAMPH1_01G13809	hypothetical protein	Sugar/inositol transporter			TMhelix					1.71	0.00	2.14	0.00	1.23	0.01	2.13	0.00
	23	FGRAMPH1_01G00123	hypothetical protein	Sulfatase, N-terminal		C02						1.71	0.00	1.63	0.00	1.14	0.01	1.14	0.03
	24	FGRAMPH1_01G24075	hypothetical protein									1.70	0.00	1.81	0.00	0.95	0.02	1.32	0.00
	25	FGRAMPH1_01G14069	hypothetical protein	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR								1.69	0.01	3.11	0.00	1.20	0.05	2.41	0.00
	26	FGRAMPH1_01G25041	peroxiredoxin PRX1	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C/ Thiol specific antioxidant								1.69	0.00	2.65	0.00	1.18	0.01	1.76	0.00
	27	FGRAMPH1_01G07541	hypothetical protein									1.65	0.00	1.52	0.00	1.02	0.00	2.19	0.00
	28	FGRAMPH1_01G16219	hypothetical protein	Protein of unknown function DUF3632								1.59	0.00	3.70	0.00	1.09	0.00	3.47	0.00
	29	FGRAMPH1_01G06635	hypothetical protein									1.58	0.00	1.54	0.00	1.90	0.00	2.01	0.00

Anzahl dargestellter DEGs/ Gesamtanzahl DEGs		Gen ID	EnsemblFungi Beschreibung	Interpro Beschreibung	Genname	Cluster_ID	TMhelix	NRRI / NRRI	log2FC	pAdjusted	NRRI / NRRI	log2FC	pAdjusted	NRRI / NRRI	log2FC	pAdjusted	NRRI / NRRI	log2FC	pAdjusted	NRRI / NRRI	log2FC	pAdjusted	
		59	FGRAMPH1_01G18153	hypothetical protein	Protein of unknown function DUF3716																		
		60	FGRAMPH1_01G26041	hypothetical protein	Glycoside hydrolase family 17																		
		61	FGRAMPH1_01G19777	hypothetical protein																			
		62	FGRAMPH1_01G19083	hypothetical protein	FAD linked oxidase, N-terminal																		
		63	FGRAMPH1_01G06707	hypothetical protein	Membrane bound O-acyl transferase, MBOAT																		
		64	FGRAMPH1_01G09169	hypothetical protein																			
		65	FGRAMPH1_01G25729	hypothetical protein	Amidohydrolase-related																		
		66	FGRAMPH1_01G13131	hypothetical protein	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, C-terminal																		
		67	FGRAMPH1_01G02677	hypothetical protein	Zn(2)-C6 fungal-type DNA-binding domain	WARI																	
		68	FGRAMPH1_01G13133	hypothetical protein	Cytochrome b5-like heme/steroid binding domain																		
		69	FGRAMPH1_01G13135	hypothetical protein	Cytochrome P450																		
		70	FGRAMPH1_01G07279	hypothetical protein	Major facilitator superfamily		C58																
		71	FGRAMPH1_01G05109	hypothetical protein	Peptidase M20		C09																
		72	FGRAMPH1_01G22003	hypothetical protein	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, C-terminal																		
		73	FGRAMPH1_01G21091	glutathione S-transferase	Glutathione S-transferase, N-terminal																		
		74	FGRAMPH1_01G27717	hypothetical protein	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR		C53																
		75	FGRAMPH1_01G10937	hypothetical protein	ABC transporter-like																		
		76	FGRAMPH1_01G06453	hypothetical protein	FAD/NAD(P)-binding domain																		
		77	FGRAMPH1_01G14793	hypothetical protein	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR																		
		78	FGRAMPH1_01G12517	hypothetical protein	Zn(2)-C6 fungal-type DNA-binding domain	AZR1																	
		79	FGRAMPH1_01G21839	hypothetical protein	FAD-binding domain																		
		80	FGRAMPH1_01G26213	hypothetical protein	Protein of unknown function DUF3112																		
		81	FGRAMPH1_01G27719	hypothetical protein	GroES-like superfamily		C53																
		82	FGRAMPH1_01G09149	hypothetical protein	Protein of unknown function DUF1593																		
		83	FGRAMPH1_01G08499	hypothetical protein	Metal-dependent hydrolase, composite domain superfamily																		
		84	FGRAMPH1_01G13401	hypothetical protein	Domain of unknown function DUF3533																		
		85	FGRAMPH1_01G09147	hypothetical protein	Amidohydrolase-related																		

Anzahl dargelegter DEGs/ Gesamtanzahl DEGs	Gen ID	EnsemblFungi Beschreibung	Interpro Beschreibung	Genname	Cluster_ID	TMhelix	log2FC		log2FC		log2FC		log2FC		
							NRRI / NRRI	pAdjusted	NRRI / NRRI	pAdjusted	NRRI / NRRI	pAdjusted	NRRI / NRRI	pAdjusted	
28/442	1	FGRAMPH1_01G21519	hypothetical protein	Cysteine dioxygenase type I								3.24	0.00	1.77	0.01
log2FC<1.5	2	FGRAMPH1_01G16029	hypothetical protein									2.62	0.00	2.10	0.00
	3	FGRAMPH1_01G19123	hypothetical protein									2.49	0.00	1.95	0.00
	4	FGRAMPH1_01G15627	hypothetical protein	ABC transporter-like	ABC3	C16	TMhelix					2.34	0.00	4.06	0.00
	5	FGRAMPH1_01G15517	carboxypeptidase S1	Peptidase S10, serine carboxypeptidase								2.25	0.00	2.80	0.00
	6	FGRAMPH1_01G15629	hypothetical protein	Zn(2)-C6 fungal-type DNA-binding domain	TF next to ABC3	C16						2.24	0.00	3.76	0.00
	7	FGRAMPH1_01G18765	hypothetical protein	Aspartic peptidase domain superfamily		C34	TMhelix					2.17	0.00	2.84	0.00
	8	FGRAMPH1_01G04173	hypothetical protein									2.13	0.00	2.18	0.00
	9	FGRAMPH1_01G04179	hypothetical protein									2.10	0.00	1.83	0.00
	10	FGRAMPH1_01G25277	hypothetical protein	FAD/NAD(P)-binding domain superfamily								1.89	0.00	5.60	0.00
	11	FGRAMPH1_01G16877	hypothetical protein	Major facilitator superfamily			TMhelix					1.85	0.00	1.85	0.00
	12	FGRAMPH1_01G13603	hypothetical protein	Acyl-CoA N-acyltransferase		C21						1.82	0.00	3.27	0.00
	13	FGRAMPH1_01G18793	hypothetical protein	Major facilitator superfamily		C34	TMhelix					1.77	0.00	1.65	0.02
	14	FGRAMPH1_01G27447	hypothetical protein									1.73	0.00	2.05	0.00
	15	FGRAMPH1_01G18983	hypothetical protein									1.73	0.00	2.12	0.00
	16	FGRAMPH1_01G11363	hypothetical protein									1.65	0.00	1.64	0.00
	17	FGRAMPH1_01G16151	hypothetical protein	Cytochrome P450			TMhelix					1.58	0.01	2.06	0.00
	18	FGRAMPH1_01G11387	hypothetical protein	NTF2-like domain superfamily								1.58	0.00	1.51	0.00
	19	FGRAMPH1_01G09633	hypothetical protein	ABC transporter-like	PDR5		TMhelix					1.57	0.00	1.91	0.00
	20	FGRAMPH1_01G08357	hypothetical protein	RidA family								1.53	0.01	3.15	0.00
	21	FGRAMPH1_01G22293	hypothetical protein	Isoprenoid synthase domain superfamily		C36						1.52	0.00	1.64	0.00
	22	FGRAMPH1_01G11749	hypothetical protein									-1.68	0.00	-1.62	0.00
	23	FGRAMPH1_01G03517	hypothetical protein	FGGY carbohydrate kinase, pentulose kinase								-1.70	0.00	-2.36	0.00
	24	FGRAMPH1_01G11745	hypothetical protein									-1.74	0.00	-2.71	0.00
	25	FGRAMPH1_01G17285	hypothetical protein									-1.80	0.00	-1.81	0.00
	26	FGRAMPH1_01G01865	hypothetical protein									-2.04	0.00	-2.17	0.00
	27	FGRAMPH1_01G08037	hypothetical protein									-2.22	0.00	-1.62	0.00
	28	FGRAMPH1_01G01001	hypothetical protein									-2.34	0.00	-2.84	0.00

Anzahl dargestellter DEGs/ Gesamtanzahl DEGs	Gen ID	EnsemblFungi Beschreibung	Interpro Beschreibung	Genname	Cluster_ID	TMhelix	log2FC		log2FC		log2FC		log2FC		log2FC		log2FC	
							NREI / NREI	pAdjusted	Δozid-4 / Δozid-4	pAdjusted	Δozid-2 / Δozid-2	pAdjusted	Δozid-1 / Δozid-1	pAdjusted	NREI / Δozid-1	pAdjusted	NREI / Δozid-2	pAdjusted
36/56 log2FC>1	1	FGRAMPH1_01G18649	sterol 24-C-methyltransferase	Methyltransferase type 11	ERG6		0.78	0.07	4.83	0.00	2.76	0.00						
	2	FGRAMPH1_01G25277	hypothetical protein	FAD/NAD(P)-binding domain superfamily			1.59	NA	3.75	0.00	7.41	0.00						
	3	FGRAMPH1_01G13023	hypothetical protein	Cytochrome P450		C24	TMhelix	0.53	0.30	3.36	0.00	1.57	0.00					
	4	FGRAMPH1_01G20829	hypothetical protein	Emopamil-binding protein		C65	TMhelix	0.88	0.07	3.35	0.00	1.91	0.00					
	5	FGRAMPH1_01G14465	cytochrome P450 51	Cytochrome P450	ERG11 / CYP51A		TMhelix	0.37	0.45	3.30	0.00	1.41	0.00					
	6	FGRAMPH1_01G12233	hypothetical protein	GroES-like superfamily				0.40	0.48	2.84	0.00	3.27	0.00					
	7	FGRAMPH1_01G15629	hypothetical protein	Zn(2)-C6 fungal-type DNA-binding domain	TF next to ABC3	C16		0.54	NA	2.74	0.00	4.27	0.00					
	8	FGRAMPH1_01G18647	hypothetical protein	Kynurenine formamidase/cyclase-like				0.66	0.17	2.44	0.00	1.12	0.00					
	9	FGRAMPH1_01G15945	hypothetical protein	Tannase/feruloyl esterase		C67		0.79	0.11	2.37	0.00	1.18	0.03					
	10	FGRAMPH1_01G11303	sterol 24-C-methyltransferase	Methyltransferase type 11	ERG6			0.85	0.05	2.19	0.00	1.35	0.00					
	11	FGRAMPH1_01G02507	cytochrome P450 51	Cytochrome P450	ERG11 / CYP51B		TMhelix	0.71	0.14	2.02	0.00	1.14	0.00					
	12	FGRAMPH1_01G27377	acetyl-CoA acetyltransferase IB	Thiolase	ERG10			0.85	0.06	1.90	0.00	1.46	0.00					
	13	FGRAMPH1_01G15431	hypothetical protein				TMhelix	0.52	0.32	1.70	0.00	1.15	0.00					
	14	FGRAMPH1_01G26961	hypothetical protein	NAD(P)-binding domain superfamily	ERG27			0.79	0.09	1.65	0.00	1.51	0.00					
	15	FGRAMPH1_01G24999	hypothetical protein	ABC transporter-like	STE6		TMhelix	0.58	0.25	1.64	0.00	1.70	0.00					
	16	FGRAMPH1_01G00633	hypothetical protein	Transferase				0.88	0.07	1.61	0.00	2.48	0.00					
	17	FGRAMPH1_01G16537	hypothetical protein	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase				0.86	0.06	1.45	0.00	1.55	0.00					
	18	FGRAMPH1_01G05809	hypothetical protein	Zn(2)-C6 fungal-type DNA-binding domain				0.22	NA	1.41	0.00	2.44	0.00					
	19	FGRAMPH1_01G16431	hypothetical protein	NAD-dependent epimerase/dehydratase				0.61	0.13	1.41	0.00	1.80	0.00					
	20	FGRAMPH1_01G24501	C-8 sterol isomerase	ERG2/sigma1 receptor-like	ERG2		TMhelix	0.72	0.06	1.30	0.00	1.26	0.00					
	21	FGRAMPH1_01G19143	hypothetical protein	Spo11/DNA topoisomerase VI subunit A				0.40	0.44	1.22	0.01	1.23	0.00					
	22	FGRAMPH1_01G17649	hypothetical protein	RTA-like protein			TMhelix	0.21	0.71	1.20	0.01	1.09	0.03					
	23	FGRAMPH1_01G25039	hypothetical protein	Aminoglycoside phosphotransferase				-0.22	0.62	1.19	0.00	1.45	0.00					
	24	FGRAMPH1_01G06003	hypothetical protein					0.37	0.51	1.17	0.00	1.26	0.00					
	25	FGRAMPH1_01G13099	hypothetical protein	Tyrosinase copper-binding domain		C23		0.14	0.81	1.16	0.00	1.40	0.01					
	26	FGRAMPH1_01G04729	cytochrome P450 61	Cytochrome P450	ERG5			0.32	0.56	1.16	0.00	1.04	0.00					
	27	FGRAMPH1_01G27573	hypothetical protein	Putative threonine/serine exporter			TMhelix	0.20	0.70	1.09	0.00	1.43	0.00					
	28	FGRAMPH1_01G13673	drug resistance protein	Major facilitator superfamily			TMhelix	0.30	0.63	1.04	0.05	1.15	0.03					
	29	FGRAMPH1_01G19613	peroxiredoxin HYR1	Glutathione peroxidase				0.44	0.06	1.04	0.00	1.03	0.00					
	30	FGRAMPH1_01G25697	hypothetical protein	Aspartic peptidase A1 family		C42		0.26	0.61	-1.07	0.01	-1.48	0.00					
	31	FGRAMPH1_01G01877	hypothetical protein	Protein of unknown function DUF3419				-0.11	0.87	-1.09	0.00	-1.43	0.00					
	32	FGRAMPH1_01G25705	hypothetical protein	Cytochrome P450		C42		0.30	0.62	-1.10	0.01	-1.61	0.00					
	33	FGRAMPH1_01G11699	hypothetical protein	DI-1/PfpI				0.02	0.98	-1.12	0.01	-1.25	0.03					
	34	FGRAMPH1_01G25699	hypothetical protein	Serine hydrolase FSH	FSH2	C42		0.19	0.76	-1.13	0.01	-1.95	0.00					
	35	FGRAMPH1_01G25695	hypothetical protein	Glutathione S-transferase, N-terminal		C42		0.05	0.95	-1.28	0.00	-2.16	0.00					
	36	FGRAMPH1_01G25707	hypothetical protein	SAM dependent carboxyl methyltransferase		C42		0.31	0.62	-1.47	0.00	-2.15	0.00					

Anzahl dargestellter DEGs/ Gesamtanzahl DEGs	Gen ID	EnsemblFungi Beschreibung	Interpro Beschreibung	Genname	Cluster_ID	TMhelix	NRRI / NRRI log2FC		Δ ozid-4 / Δ ozid-1 log2FC		Δ ozid-2 / Δ ozid-3 log2FC		NRRI / Δ ozid-4 log2FC		pAdjusted		NRRI / Δ ozid-2 log2FC		NRRI / Δ ozid-1 log2FC		pAdjusted	
							pAdjusted	log2FC	pAdjusted	log2FC	pAdjusted	log2FC	pAdjusted	log2FC	pAdjusted	log2FC	pAdjusted	log2FC	pAdjusted	log2FC	pAdjusted	
10/24	1 FGRAMPH1_01G15627	hypothetical protein	ABC transporter-like	ABC3	C16	TMhelix	4.45	0.00	6.34	0.00	2.61	0.00										
log2FC>1	2 FGRAMPH1_01G22247	hypothetical protein				TMhelix	2.06	0.00	2.65	0.00	2.44	0.00										
	3 FGRAMPH1_01G27401	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase	Ketopantoate hydroxymethyltransferase				1.53	0.00	2.82	0.00	3.01	0.00										
	4 FGRAMPH1_01G09633	hypothetical protein	ABC transporter-like	PDR5		TMhelix	1.47	0.00	2.72	0.00	3.25	0.00										
	5 FGRAMPH1_01G15949	hypothetical protein	Glycosyltransferase family 28, N-terminal domain		C67		1.33	0.00	2.88	0.00	1.91	0.00										
	6 FGRAMPH1_01G27875	hypothetical protein	Carboxylesterase, type B				1.13	0.01	2.11	0.00	2.84	0.00										
	7 FGRAMPH1_01G06405	hypothetical protein	Cytochrome P450			TMhelix	1.05	0.01	6.22	0.00	4.86	0.00										
	8 FGRAMPH1_01G05637	Delta(14)-sterol reductase	Ergosterol biosynthesis ERG4/ERG24	ERG24	C14	TMhelix	0.95	0.02	1.93	0.00	1.63	0.00										
	9 FGRAMPH1_01G06947	hypothetical protein	Marvel domain			TMhelix	0.90	0.03	1.27	0.00	1.30	0.00										
	10 FGRAMPH1_01G16829	hypothetical protein	Fatty acid hydroxylase	ERG3		TMhelix	0.81	0.01	1.23	0.00	1.02	0.00										

Tabelle E 3: Liste aller signifikant deregulierten SMC-Gene in den *azr1*^{S368Y} Mutanten und dem Wildtyp.

In der Tabelle sind die Gen- und Cluster-IDs, das Vorkommen des Gens als DEG in den *azr1*^{S368Y} und $\Delta azr1$ Mutanten, die Gesamtanzahl der Gene pro Cluster, die Annotation sowie die funktionelle Beschreibung des Gens und das Vorhandensein einer TMD aufgelistet. Zudem sind die log2FC Werte aller relevanten Vergleiche angegeben.

Gen ID	Cluster_ID	<i>azr1</i> ^{S368Y}	<i>azr1</i>	Anzahl an Genen/Cluster	Annotation	Funktionelle Beschreibung/ Goterm Bezeichnung	TMhelix	<i>NRRL</i> / <i>NRRL</i> log2FC	pA adjusted	<i>azr1</i> ^{S368Y} -1 / <i>azr1</i> ^{S368Y} -1 log2FC	pA adjusted	<i>azr1</i> ^{S368Y} -2 / <i>azr1</i> ^{S368Y} -2 log2FC	pA adjusted
FGRAMPH1_01G00347	C04			3	Zn(2)-C6 fungal-type DNA-binding domain	Transkriptions regulatorische Aktivität	0	1.50	0.00	1.84	0.00	1.87	0.00
FGRAMPH1_01G00349					beta-xylosyltransferase 1	Katalytische Aktivität	TMhelix	0.53	0.48	1.39	0.00	1.17	0.00
FGRAMPH1_01G04077	C06			13	dicarboxylic amino acid permease	Katalytische Aktivität	TMhelix	0.87	0.10	1.01	0.04	1.01	0.01
FGRAMPH1_01G05153	C10			4	ABC-transporter-like, canalicular multispecific organic anion transporter 2	Transporter Aktivität	TMhelix	0.31	0.76	1.19	0.05	1.24	0.00
FGRAMPH1_01G05513	C12			20	Acyl-CoA N-acyltransferase	Katalytische Aktivität	0	0.82	0.18	1.01	0.05	1.00	0.03
FGRAMPH1_01G05523					altered inheritance of mitochondria protein 6	Katalytische Aktivität	TMhelix	0.75	0.15	1.01	0.00	0.78	0.01
FGRAMPH1_01G05603	C13			11	fasciclin domain family protein		TMhelix	-0.32	0.75	-0.90	0.03	-1.74	0.00
FGRAMPH1_01G05601					conidial pigment biosynthesis oxidase arb2 brown2	Katalytische Aktivität	TMhelix	-0.57	0.45	-1.20	0.00	-1.73	0.00
FGRAMPH1_01G05599					dimethylaniline monooxygenase 3	Katalytische Aktivität	0	-0.96	0.10	-2.12	0.00	-2.54	0.00
FGRAMPH1_01G05597					sterigmatocystin 8-o-methyltransferase	Katalytische Aktivität	0	-0.66	0.39	-1.89	0.00	-2.23	0.00
FGRAMPH1_01G05595					conidial pigment polyketide synthase partial		0	-0.77	0.27	-2.06	0.00	-2.25	0.00
FGRAMPH1_01G05593					polyketide synthase	Katalytische Aktivität	0	-0.63	0.43	-2.23	0.00	-2.41	0.00
FGRAMPH1_01G05591					Zn(2)-C6 fungal-type DNA-binding domain	Transkriptions regulatorische Aktivität	0	-0.43	0.19	-0.75	0.00	-0.62	0.04
FGRAMPH1_01G05587					6-hydroxy-d-nicotine oxidase	Katalytische Aktivität	0	-0.47	0.47	-0.83	0.00	-1.18	0.00
FGRAMPH1_01G05569					MFS maltose permease mal61	Transporter Aktivität	TMhelix	0.50	0.56	1.23	0.03	1.17	0.03
FGRAMPH1_01G05637	C14			9	delta14-sterol reductase	Katalytische Aktivität	TMhelix	1.53	0.00	1.17	0.02	1.48	0.00
FGRAMPH1_01G15629	C16			10	Zn(2)-C6 fungal-type DNA-binding domain	Transkriptions regulatorische Aktivität	0	2.48	NA	5.30	0.00	4.59	0.00
FGRAMPH1_01G15627					atp binding cassette transporter	Transporter Aktivität	TMhelix	0.45	0.40	4.70	0.00	1.27	NA
FGRAMPH1_01G14149	C18			18	EGF-like domain		0	-0.90	0.12	-1.66	0.00	-1.51	0.00
FGRAMPH1_01G13579	C22			9	ABC-transporter-like	Transporter Aktivität	TMhelix	-0.64	0.18	-1.18	0.00	-1.20	0.00
FGRAMPH1_01G13581					nonribosomal peptide synthetase	Katalytische Aktivität	0	-0.72	0.18	-1.57	0.00	-1.43	0.00
FGRAMPH1_01G13583					MFS siderophore iron transporter mirb	Transporter Aktivität	TMhelix	-0.51	0.39	-0.86	0.00	-0.96	0.00

Gen ID	Cluster_ID	<i>azr1</i> ^{S368Y}	Δ <i>azr1</i>	Anzahl an Genen/Cluster	Annotation	Funktionelle Beschreibung/ Goterm Bezeichnung	TMhelix	<div style="background-color: #800000; color: white; padding: 2px;"> <i>NRRL</i> / <i>NRRL</i> log2FC pAdjusted <i>azr1</i>^{S368Y} -1 / <i>azr1</i>^{S368Y} -1 log2FC pAdjusted <i>azr1</i>^{S368Y} -2 / <i>azr1</i>^{S368Y} -2 log2FC pAdjusted </div>					
FGRAMPH1_01G13021	C24			12	Peptidase S1C	Katalytische Aktivität	0	0.73	0.03	0.95	0.03	0.83	0.01
FGRAMPH1_01G13023					cytochrome p450	Cytochrome P450	TMhelix	3.01	0.00	3.54	0.00	2.17	0.00
FGRAMPH1_01G12657	C26			8	hypothetical protein	Unbekannte Funktion	0	0.64	0.20	1.21	0.00	0.91	0.00
FGRAMPH1_01G17743	C33			9	MFS	Transporter Aktivität	TMhelix	0.94	0.07	1.19	0.00	0.89	0.01
FGRAMPH1_01G25691	C42			12	fusarin c cluster-polyketide synthase nrps	Katalytische Aktivität	0	-1.10	0.03	-2.36	0.00	-2.00	0.00
FGRAMPH1_01G25693					alpha beta hydrolase	Katalytische Aktivität	0	-1.40	0.00	-2.43	0.00	-1.92	0.00
FGRAMPH1_01G25695					fusarin c cluster-translation elongation factor	Katalytische Aktivität	0	-1.49	0.00	-3.07	0.00	-1.70	0.00
FGRAMPH1_01G25697					fusarin c cluster-peptidase	Katalytische Aktivität	0	-1.14	0.04	-2.75	0.00	-2.12	0.00
FGRAMPH1_01G25699					fusarin c cluster-oxidoreductase	Katalytische Aktivität	0	-1.52	0.00	-2.71	0.00	-1.78	0.00
FGRAMPH1_01G25701					MFS fusarin c cluster-transporter	Transporter Aktivität	TMhelix	-1.74	0.00	-2.74	0.00	-2.12	0.00
FGRAMPH1_01G25703					fusarin c cluster-oxidoreductase	Katalytische Aktivität	0	-2.14	0.00	-2.98	0.00	-2.00	0.00
FGRAMPH1_01G25705					fusarin c cluster-cytochrome p450	Cytochrome P450	0	-1.45	0.00	-2.49	0.00	-1.97	0.00
FGRAMPH1_01G25707					fusarin c cluster-methyltransferase	Katalytische Aktivität	0	-2.21	0.00	-2.70	0.00	-1.47	0.00
FGRAMPH1_01G08909	C51			34	proteinase t precursor	Katalytische Aktivität	0	0.97	0.02	1.56	0.00	1.14	0.00
FGRAMPH1_01G26715	C57			7	MFS aflatoxin efflux pump aflt	Transporter Aktivität	TMhelix	-0.24	0.78	-1.02	0.02	-0.87	0.03
FGRAMPH1_01G21041	C63			4	dipeptidyl peptidase iii	Katalytische Aktivität	0	-0.86	0.09	-1.16	0.00	-1.00	0.00
FGRAMPH1_01G21039					hypothetical protein	Unbekannte Funktion	0	-0.92	0.05	-1.70	0.00	-1.09	0.00
FGRAMPH1_01G21037					hypothetical protein	Unbekannte Funktion	0	-0.69	0.20	-1.33	0.00	-1.03	0.00
FGRAMPH1_01G21031					atp-binding protein		0	-0.78	0.17	-0.91	0.02	-1.01	0.04
FGRAMPH1_01G20967	C64			8	ankyrin protein		0	0.34	0.68	1.78	0.00	1.12	0.03
FGRAMPH1_01G20829	C65			11	3-beta-hydroxysteroid-delta -isomerase	Katalytische Aktivität	TMhelix	0.69	0.27	2.79	0.00	2.66	0.00
FGRAMPH1_01G20837					allantoinase	Katalytische Aktivität	0	0.84	0.09	0.88	0.02	0.78	0.03
FGRAMPH1_01G15947	C67			7	Zn(2)-C6 fungal-type DNA-binding domain	Transkriptions regulatorische Aktivität	0	0.68	0.10	0.79	0.01	1.05	0.01

Tabelle E 4: Liste aller signifikant deregulierten SMC-Gene in den $\Delta azr1$ Mutanten und dem Wildtyp.

In der Tabelle sind die Gen- und Cluster-IDs, das Vorkommen des Gens als DEG in den $azr1^{S368Y}$ und $azr1^{S368Y}$ Mutanten, die Gesamtanzahl der Gene pro Cluster, die Annotation sowie die funktionelle Beschreibung des Gens und das Vorhandensein einer TMD aufgelistet. Zudem sind die log2FC Werte aller relevanten Vergleiche angegeben.

Gen ID	Cluster_ID	$azr1^{S368Y}$	$\Delta azr1$	Anzahl an Genen/Cluster	Annotation	Funktionelle Beschreibung/ GoTerm Bezeichnung	TMhelix	NRRL/NRRL log2FC	pAdjusted	$\Delta azr1^{-1} / \Delta azr1^{-1}$ log2FC	pAdjusted	$\Delta azr1^{-2} / \Delta azr1^{-2}$ log2FC	pAdjusted	NRRL / $\Delta azr1^{-1}$ log2FC	pAdjusted	NRRL / $\Delta azr1^{-2}$ log2FC	pAdjusted	NRRL / $\Delta azr1^{-1}$ log2FC	pAdjusted	NRRL / $\Delta azr1^{-2}$ log2FC	pAdjusted
FGRAMPH1_01G00163	C02			18	aliphatic nitrilase	Katalytische Aktivität	0	0.55	0.09	-0.39	0.47	0.17	0.87	1.19	0.00	0.74	0.05	0.15	0.74	0.37	0.43
FGRAMPH1_01G00153					Thioesterase	Katalytische Aktivität	0	0.82	NA	-0.77	0.24	-0.86	0.19	3.02	0.00	1.70	0.01	1.00	0.04	-0.73	0.28
FGRAMPH1_01G00137					protein unc-45 like protein b, SET domain	Katalytische Aktivität	0	-0.06	NA	-0.28	0.84	-0.54	0.53	1.93	0.00	1.84	0.00	1.84	0.00	0.92	0.26
FGRAMPH1_01G00135					hypothetical protein	Unbekannte Funktion	0	-0.21	0.74	-0.45	0.58	-0.44	0.61	0.91	0.04	1.04	0.01	0.59	0.29	0.65	0.36
FGRAMPH1_01G00133					hypothetical protein	Unbekannte Funktion	0	0.53	NA	-0.28	0.82	-0.50	0.58	1.38	0.01	2.58	0.00	-0.03	0.97	0.46	0.62
FGRAMPH1_01G00123					Sulfatase, N-terminal	Katalytische Aktivität	0	0.23	NA	-0.25	0.84	-0.14	0.91	1.71	0.00	1.63	0.00	1.14	0.01	1.14	0.03
FGRAMPH1_01G00221	C03			5	MFS Sugar/inositol transporter	Transporter Aktivität	TMhelix	-0.14	0.77	0.25	0.84	0.83	NA	-2.21	0.00	-4.68	0.00	-0.32	NA	-0.41	NA
FGRAMPH1_01G00223					cytochrome p450 monooxygenase	Cytochrome P450	0	0.56	0.29	-0.18	0.92	-0.03	0.98	1.11	0.01	2.51	0.00	0.00	1.00	1.58	0.00
FGRAMPH1_01G01161	C05			9	pre-mrna-splicing factor atp-dependent rna helicase prp16	Katalytische Aktivität	0	-0.15	0.52	0.13	0.87	0.00	1.00	-0.51	0.01	-0.51	0.00	-0.22	0.31	-0.34	0.15
FGRAMPH1_01G01163					wd repeat-containing protein		0	-0.72	0.03	0.31	0.50	0.29	0.71	-0.69	0.01	-1.16	0.00	0.43	0.12	-0.02	0.98
FGRAMPH1_01G01175					hypothetical protein	Unbekannte Funktion	0	0.29	0.42	0.50	0.20	0.27	0.55	-1.44	0.00	-1.24	0.00	-1.19	0.00	-1.22	0.00
FGRAMPH1_01G04077	C06			13	dicarboxylic amino acid permease	Katalytische Aktivität	TMhelix	-0.78	0.06	0.36	0.72	0.62	0.18	-0.86	0.03	-0.94	0.01	0.47	0.40	0.67	0.13
FGRAMPH1_01G04089					atp-grasp fold	Katalytische Aktivität	0	0.03	0.97	-0.15	0.90	-0.37	0.63	1.22	0.00	1.12	0.01	1.05	0.00	0.73	0.05
FGRAMPH1_01G04241	C07			17	acetyl-coenzyme a synthetase	Katalytische Aktivität	0	-0.35	0.44	0.41	0.38	0.51	0.27	-0.81	0.00	-0.67	0.02	0.04	0.95	0.30	0.57
FGRAMPH1_01G04243					demethylmenaquinone methyltransferase	Katalytische Aktivität	0	0.21	0.69	-0.74	0.06	-0.65	0.21	2.67	0.00	2.04	0.00	1.56	0.00	1.08	0.00
FGRAMPH1_01G04329	C08			15	organic hydroperoxide resistance protein	Katalytische Aktivität	0	-0.13	0.82	-0.03	0.98	-0.03	0.98	-0.62	0.03	-2.01	0.00	-0.45	0.38	-1.73	0.00
FGRAMPH1_01G04339					hypothetical protein	Unbekannte Funktion	0	-0.16	0.72	-0.34	0.65	-0.34	0.53	1.36	0.00	0.65	0.00	1.06	0.00	0.46	0.27
FGRAMPH1_01G05089	C09			12	cholesterol 7-alpha-monooxygenase	Cytochrome P450	TMhelix	-0.33	0.53	-0.38	0.67	0.63	0.36	1.42	0.00	-1.79	0.00	1.25	0.01	-0.58	0.30
FGRAMPH1_01G05091					Wax synthase domain	Katalytische Aktivität	TMhelix	-0.80	0.10	-0.06	0.98	0.48	NA	1.12	0.02	-2.08	0.00	1.94	0.00	-0.02	0.99
FGRAMPH1_01G05093					cytochrome p450	Cytochrome P450	TMhelix	-0.60	0.08	0.00	1.00	0.46	0.37	0.45	0.05	-1.89	0.00	1.01	0.01	-0.70	0.05
FGRAMPH1_01G05095					related to cytochrome p450 7b1	Cytochrome P450	TMhelix	-0.75	0.07	0.20	0.80	0.65	0.41	1.06	0.00	-0.88	0.18	1.97	0.00	0.97	0.05
FGRAMPH1_01G05097					Wax synthase domain	Katalytische Aktivität	TMhelix	-0.20	0.73	0.05	0.98	0.63	0.41	0.77	0.02	-1.58	0.00	0.99	0.02	-0.48	0.41
FGRAMPH1_01G05099					P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase	Katalytische Aktivität	TMhelix	-0.60	0.05	0.08	0.94	0.85	0.13	0.70	0.00	-1.28	0.00	1.39	0.00	0.38	0.41
FGRAMPH1_01G05103					cytochrome p450	Cytochrome P450	TMhelix	-0.27	0.39	-0.20	0.84	0.68	0.21	0.90	0.00	-0.98	0.00	0.93	0.00	0.12	0.85
FGRAMPH1_01G05105					RTA-like protein		TMhelix	-0.43	0.38	-0.03	0.99	0.68	0.38	0.86	0.02	-1.63	0.00	1.26	0.00	-0.12	0.89
FGRAMPH1_01G05109					metal-dependent amidase aminoacylase carboxypeptidase protein	Katalytische Aktivität	0	0.37	0.49	0.07	NA	-0.22	NA	-3.10	0.00	-4.35	0.00	-3.38	0.00	-5.24	0.00

Gen ID	Cluster_ID	azr1 ^{S368Y}	azr1	Anzahl an Genen/Cluster	Annotation	Funktionelle Beschreibung/ GoTerm Bezeichnung	TMhelix	NRRL / NRRL log2FC			Δ azr1 -1 / Δ azr1 -1 log2FC			NRRL / Δ azr1 -1 log2FC			NRRL / Δ azr1 -2 log2FC				
								pAdjusted			pAdjusted			pAdjusted			pAdjusted				
FGRAMPH1_01G05449	C11			4	5 -p- -4-tetraphosphate phosphorylase 2	Katalytische Aktivität	0	0.15	0.80	-0.27	0.83	0.10	0.94	0.88	0.04	0.96	0.01	0.31	0.64	0.79	0.19
FGRAMPH1_01G05437					LysM domain		0	-0.61	0.06	0.13	0.94	0.89	0.07	0.62	0.11	-0.56	0.01	1.42	0.00	1.10	0.01
FGRAMPH1_01G05507	C12			20	malic acid transport protein	Transporter Aktivität	TMhelix	-0.23	0.63	0.44	0.29	0.52	0.26	0.40	0.16	0.78	0.01	1.09	0.00	1.60	0.00
FGRAMPH1_01G05517					Glutathione S-transferase, N-terminal	Katalytische Aktivität	0	0.28	0.59	-0.72	0.07	-0.38	0.68	1.39	0.00	1.45	0.00	0.24	0.67	0.55	0.41
FGRAMPH1_01G05523					altered inheritance of mitochondria protein 6	Katalytische Aktivität	TMhelix	-0.52	0.07	0.00	1.00	0.38	0.31	0.36	0.20	1.28	0.00	0.91	0.00	2.21	0.00
FGRAMPH1_01G05603	C13			11	fasciclin domain family protein		TMhelix	-0.63	0.18	-1.49	0.00	-0.82	0.16	4.42	0.00	2.22	0.00	3.42	0.00	0.20	0.86
FGRAMPH1_01G05601					conidial pigment biosynthesis oxidase arb2 brown2	Katalytische Aktivität	TMhelix	-0.72	0.15	-1.32	0.00	-0.67	NA	3.68	0.00	1.81	0.01	3.38	0.00	0.24	0.82
FGRAMPH1_01G05587					6-hydroxy-d-nicotine oxidase	Katalytische Aktivität	0	-0.15	0.58	-0.95	0.00	-1.20	0.02	1.60	0.00	0.81	0.06	0.75	0.00	-0.54	0.23
FGRAMPH1_01G05577					ABC-transporter-like, multidrug resistance protein	Transporter Aktivität	TMhelix	-0.09	0.88	0.10	0.96	0.29	0.67	1.29	NA	1.06	0.00	1.81	0.00	1.49	0.00
FGRAMPH1_01G05575					nonribosomal peptide synthetase	Katalytische Aktivität	0	0.43	NA	-0.12	0.94	0.02	0.99	1.91	0.00	1.33	0.00	0.69	0.33	-0.18	NA
FGRAMPH1_01G05637	C14			9	delta14-sterol reductase	Katalytische Aktivität	TMhelix	0.95	0.02	1.93	0.00	1.63	0.00	-0.53	0.22	0.18	0.72	0.40	0.33	0.64	0.02
FGRAMPH1_01G05653					hypothetical protein	Unbekannte Funktion	TMhelix	0.06	0.93	-0.42	0.63	-0.88	0.06	1.28	0.00	1.82	0.00	0.64	0.23	0.75	0.16
FGRAMPH1_01G05683					hypothetical protein	Unbekannte Funktion	TMhelix	-0.34	0.56	-0.70	0.28	-0.07	0.96	1.51	0.00	0.97	0.01	1.04	0.03	1.15	0.07
FGRAMPH1_01G05743	C15			9	heterokaryon incompatibility protein or allele		0	-0.18	0.71	-0.32	0.72	-0.30	0.70	0.70	0.01	0.43	0.05	0.49	0.31	0.27	0.66
FGRAMPH1_01G15633	C16			10	small secreted protein		0	-0.27	0.44	0.17	0.89	0.97	0.04	0.80	0.01	-1.09	0.00	1.29	0.00	0.33	0.40
FGRAMPH1_01G15629					Zn(2)-C6 fungal-type DNA-binding domain	Transkriptions regulatorische Aktivität	0	0.54	NA	2.74	0.00	4.27	0.00	NA	NA	NA	NA	2.24	0.00	3.76	0.00
FGRAMPH1_01G15627					atp binding cassette transporter	Transporter Aktivität	TMhelix	4.45	0.00	6.34	0.00	2.61	0.00	-0.42	0.57	-0.03	0.98	2.34	0.00	4.06	0.00
FGRAMPH1_01G14121	C18			18	MFS	Transporter Aktivität	TMhelix	-0.93	0.05	-0.05	0.98	-0.08	NA	-1.14	0.04	-2.00	0.00	-0.08	0.93	-0.69	0.42
FGRAMPH1_01G14141					amidohydrolase 2	Katalytische Aktivität	0	0.14	0.82	-0.88	0.07	0.00	1.00	1.26	0.00	3.85	0.00	0.03	0.97	3.50	0.00
FGRAMPH1_01G14155					Cerato-platanin		0	0.48	0.11	0.05	0.97	0.36	0.54	0.63	0.00	0.51	0.02	0.16	0.69	0.39	0.38

Gen ID	Cluster_ID	azr1 ^{S368Y}	Δ azr1	Anzahl an Genen/Cluster	Annotation	Funktionelle Beschreibung/ GoTerm Bezeichnung	TMhelix	NRRL / NRRL log2FC			Δ azr1 ⁻¹ / Δ azr1 ⁻¹ log2FC			NRRL / Δ azr1 ⁻¹ log2FC			NRRL / Δ azr1 ⁻² log2FC				
								pAdjusted			pAdjusted			pAdjusted			pAdjusted				
FGRAMPH1_01G14017	C19			21	Zn(2)-C6 fungal-type DNA-binding domain	Transkriptions regulatorische Aktivität	0	0.11	NA	-0.25	0.86	-0.39	0.66	1.68	0.00	1.38	0.01	1.14	0.04	0.67	0.37
FGRAMPH1_01G14047					Chlorophyllase	Katalytische Aktivität	0	-0.45	NA	-1.15	0.02	-0.74	0.32	1.83	0.00	1.34	0.01	0.57	0.43	0.64	0.45
FGRAMPH1_01G14057					nitrogen assimilation transcription factor nit-4	Transkriptions regulatorische Aktivität	0	-0.55	0.11	0.64	0.26	-0.32	0.73	-1.55	0.00	-0.80	0.04	-0.15	0.79	-0.59	0.21
FGRAMPH1_01G13877	C20			8	hypothetical protein FG05_30113	Unbekannte Funktion	0	0.04	0.92	-0.05	0.96	0.22	0.68	0.69	0.00	0.44	0.04	0.60	0.00	0.63	0.03
FGRAMPH1_01G13603	C21			5	related to aerobactin siderophore biosynthesis protein iucb	Katalytische Aktivität	0	-0.48	0.36	0.12	0.95	0.55	0.48	0.95	0.06	2.08	0.00	1.82	0.00	3.27	0.00
FGRAMPH1_01G13555	C22			9	MFS	Transporter Aktivität	TMhelix	-0.37	0.44	0.08	0.97	-0.12	0.90	-0.89	0.01	-1.59	0.00	-0.33	0.56	-1.24	0.00
FGRAMPH1_01G13095	C23			15	glycosyl hydrolase family 17	Katalytische Aktivität	0	0.33	0.14	0.54	0.01	0.63	0.16	-0.37	0.03	-0.48	0.02	-0.15	0.55	-0.09	0.87
FGRAMPH1_01G13099					Tyrosinase copper-binding domain	Katalytische Aktivität	0	0.14	0.81	1.16	0.00	1.40	0.01	-0.32	0.44	-0.63	0.23	0.80	0.06	1.07	0.05
FGRAMPH1_01G13023	C24			12	cytochrome p450	Cytochrome P450	TMhelix	0.53	0.30	3.36	0.00	1.57	0.00	-1.25	0.05	0.27	0.75	0.44	0.24	0.67	0.03
FGRAMPH1_01G12657	C26			8	hypothetical protein	Unbekannte Funktion	0	-0.31	0.50	0.22	0.85	0.74	0.04	-0.94	0.01	-0.98	0.00	-0.34	0.47	0.17	0.75
FGRAMPH1_01G12659					MFS	Transporter Aktivität	TMhelix	-0.43	0.44	0.14	0.94	0.19	NA	-1.66	0.00	-1.89	0.00	-0.84	0.18	-1.08	0.10
FGRAMPH1_01G12663					pot family proton-dependent oligopeptide transporter	Transporter Aktivität	TMhelix	-0.43	0.36	0.17	0.90	0.88	0.00	-1.12	0.00	-1.89	0.00	-0.40	0.41	-0.42	0.38
FGRAMPH1_01G12437	C27			5	alcohol dehydrogenase	Katalytische Aktivität	0	0.12	NA	0.13	0.95	0.32	0.66	0.80	0.20	1.49	0.00	0.96	0.05	1.65	0.00
FGRAMPH1_01G12443					sulfide quinone-reductase	Katalytische Aktivität	0	0.14	0.72	0.13	0.91	0.15	0.87	0.57	0.03	0.87	0.00	0.56	0.04	0.90	0.01
FGRAMPH1_01G11971	C28			4	phytoene dehydrogenase	Katalytische Aktivität	TMhelix	-0.11	0.84	-0.07	0.97	0.01	0.99	1.37	0.00	0.71	0.04	1.25	0.00	0.77	0.20
FGRAMPH1_01G16081	C31			13	related to tri201-trichothecene 3-o-acetyltransferase	Katalytische Aktivität	0	0.25	0.70	0.19	0.90	-0.38	0.69	1.13	0.01	1.49	0.00	0.90	0.09	0.39	0.69
FGRAMPH1_01G16083					related to integral membrane protein pth11		TMhelix	0.09	NA	0.02	1.00	-0.40	0.65	1.27	0.02	2.32	0.00	0.95	0.12	0.58	0.52
FGRAMPH1_01G16085					polyketide synthase	Katalytische Aktivität	0	0.52	0.33	-0.08	0.97	-0.89	0.18	1.55	0.00	2.18	0.00	0.46	0.52	-0.14	0.90
FGRAMPH1_01G17743	C33			9	MFS	Transporter Aktivität	TMhelix	-0.70	0.09	0.43	0.48	1.03	0.01	0.13	0.76	-0.69	0.06	1.37	0.00	1.27	0.00
FGRAMPH1_01G17745					translation initiation factor eif-2b subunit 2		0	-0.38	0.31	0.35	0.62	0.45	0.42	0.29	0.42	-0.15	0.74	1.08	0.00	0.79	0.01
FGRAMPH1_01G17751					nonribosomal peptide synthetase	Katalytische Aktivität	0	-0.07	0.89	-0.11	0.93	-0.20	0.70	-0.94	0.00	-0.52	0.07	-0.98	0.00	-0.66	0.01
FGRAMPH1_01G18793	C34			3	MFS	Transporter Aktivität	TMhelix	-0.11	NA	0.84	NA	0.79	NA	-0.14	NA	-0.17	NA	1.77	0.00	1.65	0.02
FGRAMPH1_01G18775					hypothetical protein	Unbekannte Funktion	TMhelix	0.29	0.59	-0.55	0.42	-1.10	0.00	1.69	0.00	1.90	0.00	0.60	0.24	0.34	0.54
FGRAMPH1_01G18773					sterigmatocystin 8-o-methyltransferase	Katalytische Aktivität	0	0.12	0.84	-0.45	0.57	-1.34	0.00	2.32	0.00	2.92	0.00	1.40	0.00	1.23	0.00
FGRAMPH1_01G18771					ATPase, AAA-type, core		0	0.34	0.21	-0.17	0.81	-0.44	0.16	-0.17	0.45	0.33	0.15	-0.70	0.01	-0.48	0.05
FGRAMPH1_01G18765					Aspartic peptidase domain superfamily	Katalytische Aktivität	TMhelix	-0.68	NA	0.11	0.96	0.95	0.05	0.68	0.33	0.40	0.56	2.17	0.00	2.84	0.00
FGRAMPH1_01G18763					Glycoside hydrolase family 47	Katalytische Aktivität	0	0.05	0.90	-0.05	0.97	-0.03	0.98	0.66	0.01	1.02	0.00	0.56	0.02	0.96	0.00

Gen ID	Cluster_ID	azr1 ^{S368Y}	Δ azr1	Anzahl an Genen/Cluster	Annotation	Funktionelle Beschreibung/ GoTerm Bezeichnung	TMhelix	NRRL / NRRL log2FC			Δ azr1 -1 / Δ azr1 -1 log2FC			NRRL / Δ azr1 -1 log2FC			NRRL / Δ azr1 -2 log2FC				
								pAdjusted			pAdjusted			pAdjusted			pAdjusted				
FGRAMPH1_01G19349	C35			11	l-aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase	Katalytische Aktivität	0	-0.63	0.01	0.21	0.80	0.18	0.80	0.06	0.86	-0.35	0.28	0.93	0.00	0.52	0.05
FGRAMPH1_01G19361					Histone acetyltransferase domain, MYST-type	Katalytische Aktivität	0	-0.28	0.40	-0.15	0.89	-0.01	0.99	-0.59	0.01	-0.53	0.02	-0.44	0.19	-0.23	0.43
FGRAMPH1_01G22293	C36			7	longiborneol synthase	Katalytische Aktivität	0	-0.36	0.38	-0.10	0.92	0.88	0.07	1.23	0.00	0.19	0.71	1.52	0.00	1.64	0.00
FGRAMPH1_01G22301					activator of stress proteins 1, Zn(2)-C6 fungal-type DNA-binding domain	Transkriptions regulatorische Aktivität	0	-0.77	0.11	-0.04	0.99	-0.47	0.48	0.38	0.49	0.82	0.10	1.47	0.00	1.45	0.00
FGRAMPH1_01G22329	C37			15	Transcription factor domain, fungi	Transkriptions regulatorische Aktivität	0	-0.55	0.25	-0.33	0.76	-0.01	0.99	-0.95	0.03	-1.26	0.00	-0.62	0.26	-0.52	0.42
FGRAMPH1_01G22339					haloacetate dehalogenase h-1	Katalytische Aktivität	0	-0.02	0.98	0.07	0.98	0.45	0.63	-2.01	0.00	-2.05	0.00	-1.45	0.01	-1.02	0.17
FGRAMPH1_01G22455	C38			14	serine threonine-protein kinase rio1	Katalytische Aktivität	0	-0.79	0.00	0.38	0.44	0.24	0.72	-1.32	0.00	-1.64	0.00	-0.06	0.91	-0.52	0.14
FGRAMPH1_01G22465					linear gramicidin synthase subunit d	Katalytische Aktivität	0	-0.47	0.18	0.45	0.29	0.13	0.81	-1.16	0.00	-0.71	0.01	-0.15	0.73	-0.04	0.94
FGRAMPH1_01G22469					Amino acid transporter	Transporter Aktivität	TMhelix	-0.51	0.25	0.18	0.86	0.79	0.01	-0.92	0.00	-1.45	0.00	-0.09	0.89	0.00	1.00
FGRAMPH1_01G22531	C39			8	Amino acid transporter	Transporter Aktivität	TMhelix	0.15	0.79	0.53	0.35	0.46	0.52	-1.43	0.00	-1.20	0.00	-0.95	0.01	-0.76	0.12
FGRAMPH1_01G22537					Polyketide cyclase SnoaL-like	Katalytische Aktivität	0	-0.57	0.26	-0.09	0.96	0.75	0.31	1.08	0.04	-1.36	0.03	1.71	0.00	0.57	0.45
FGRAMPH1_01G22541					palmitoyltransferase akr1	Katalytische Aktivität	TMhelix	0.10	0.72	0.09	0.92	-0.02	0.99	-0.39	0.05	0.59	0.02	-0.40	0.03	0.49	0.02
FGRAMPH1_01G25145	C40			17	MFS Sugar/inositol transporter, mfs sp sugar:h+ symporter	Transporter Aktivität	TMhelix	0.05	0.95	0.56	0.46	-0.26	0.82	-2.07	0.00	-1.53	0.02	-1.68	0.00	-2.65	0.00
FGRAMPH1_01G25695	C42			12	fusarin c cluster-translation elongation factor	Katalytische Aktivität	0	0.05	0.95	-1.28	0.00	-2.16	0.00	1.69	0.00	1.15	0.01	0.07	0.94	-1.47	0.00
FGRAMPH1_01G25697					fusarin c cluster-peptidase	Katalytische Aktivität	0	0.26	0.61	-1.07	0.01	-1.48	0.00	1.20	0.00	0.13	0.88	-0.40	0.48	-2.15	0.00
FGRAMPH1_01G25699					fusarin c cluster-oxidoreductase	Katalytische Aktivität	0	0.19	0.76	-1.13	0.01	-1.95	0.00	1.41	0.00	0.67	0.20	-0.23	0.76	-1.96	0.00
FGRAMPH1_01G25705					fusarin c cluster-cytochrome p450	Cytochrome P450	0	0.30	0.62	-1.10	0.01	-1.61	0.00	1.41	0.00	0.56	0.42	-0.38	0.64	-2.39	0.00
FGRAMPH1_01G25707					fusarin c cluster-methyltransferase	Katalytische Aktivität	0	0.31	0.62	-1.47	0.00	-2.15	0.00	2.18	0.00	0.95	0.05	-0.21	0.81	-2.09	0.00
FGRAMPH1_01G10841	C44			13	polyketide synthase	Katalytische Aktivität	0	-0.08	0.90	-0.19	0.91	0.09	0.92	1.93	0.00	-0.75	0.04	1.50	0.00	-0.53	0.26
FGRAMPH1_01G09651	C46			3	long-chain-fatty-acid- ligase	Katalytische Aktivität	0	0.15	0.81	0.40	0.65	0.04	0.98	-1.84	0.00	-1.90	0.00	-1.43	0.00	-1.99	0.00
FGRAMPH1_01G09379	C47			5	beta -mannosyl-glycoprotein 4-beta-n-acetylglucosaminyltransferase	Katalytische Aktivität	0	0.18	0.69	-0.70	0.15	-0.34	0.57	0.95	0.01	1.11	0.00	-0.03	0.96	0.53	0.18
FGRAMPH1_01G09381					hypothetical protein	Unbekannte Funktion	TMhelix	-0.05	0.96	-0.31	0.79	-0.48	0.42	1.31	0.01	1.36	0.01	0.89	0.13	0.97	0.06
FGRAMPH1_01G09387					hypothetical protein	Unbekannte Funktion	0	0.40	NA	-0.25	0.85	0.02	0.99	1.92	0.00	1.70	0.00	1.00	0.05	1.25	0.02
FGRAMPH1_01G09063	C49			8	nadh oxidase	Katalytische Aktivität	0	0.54	0.25	0.29	0.82	-0.41	0.54	2.27	0.00	2.74	0.00	1.98	0.00	1.55	0.00
FGRAMPH1_01G09065					Amidase signature domain	Katalytische Aktivität	0	0.15	0.78	0.46	0.55	-0.18	0.85	1.27	0.00	1.84	0.00	1.49	0.00	1.39	0.00
FGRAMPH1_01G09025	C50			6	related to dehydrogenases and related proteins	Katalytische Aktivität	0	0.24	NA	-0.34	0.73	-0.55	0.50	1.50	0.00	2.08	0.00	0.59	0.37	0.75	0.33
FGRAMPH1_01G09031					alcohol dehydrogenase	Katalytische Aktivität	0	0.00	NA	-0.39	0.66	-0.70	0.22	1.64	0.00	1.70	0.00	1.40	0.00	0.98	0.08

Gen ID	Cluster_ID	azr1 ^{S368Y}	azr1	Anzahl an Genen/Cluster	Annotation	Funktionelle Beschreibung/ GoTerm Bezeichnung	TMhelix	NRRL / NRRL log2FC			Δ azr1 -1 / Δ azr1 -1 log2FC			Δ azr1 -2 / Δ azr1 -2 log2FC			NRRL / Δ azr1 -1 log2FC			Δ azr1 -2 log2FC		
								pAdjusted			pAdjusted			pAdjusted			pAdjusted			pAdjusted		
FGRAMPH1_01G08909	C51			34	proteinase t precursor	Katalytische Aktivität	0	-0.26	0.68	0.51	0.42	1.39	0.00	1.05	0.00	0.06	0.91	1.48	0.01	1.95	0.00	
FGRAMPH1_01G28009	C52			29	thiamine repressible proteins regulatory protein thi1	Transkriptions regulatorische Aktivität	0	-0.05	0.94	-0.48	0.42	-0.58	0.29	1.14	0.00	1.14	0.00	0.69	0.09	0.56	0.28	
FGRAMPH1_01G27713	C53			14	hypothetical protein FGSG_09189	Katalytische Aktivität	0	-0.14	0.83	-0.62	0.26	-0.23	0.82	0.80	0.04	-0.79	0.04	0.24	0.72	-0.78	0.20	
FGRAMPH1_01G27717					glucose and ribitol dehydrogenase like protein 1	Katalytische Aktivität	0	-0.17	0.79	-0.33	0.75	-0.76	0.14	-3.50	0.00	-3.66	0.00	-2.23	0.00	-2.98	0.00	
FGRAMPH1_01G27719					fusarubin cluster-oxidoreductase	Katalytische Aktivität	0	-0.09	0.89	-0.01	NA	-0.07	NA	-5.04	0.00	-5.16	0.00	-1.21	0.03	-2.24	0.00	
FGRAMPH1_01G27735					related to adp-ribose pyrophosphatase	Katalytische Aktivität	0	-0.36	0.12	-0.26	0.74	0.28	0.53	0.46	0.11	0.45	0.05	0.54	0.04	1.13	0.00	
FGRAMPH1_01G27737					nitrogen assimilation transcription factor nit-4	Transkriptions regulatorische Aktivität	0	0.00	0.99	0.42	0.48	0.75	0.12	-0.94	0.00	-0.81	0.01	-0.46	0.23	0.06	0.92	
FGRAMPH1_01G27641	C54			10	negative cofactor 2 complex subunit beta	Transkriptions regulatorische Aktivität	0	0.08	0.82	-0.18	0.81	0.01	0.99	0.65	0.01	0.61	0.00	0.38	0.11	0.54	0.02	
FGRAMPH1_01G27647					homocysteine s-methyltransferase	Katalytische Aktivität	0	-0.39	0.22	-0.22	0.82	0.28	0.68	0.68	0.02	0.18	0.67	0.84	0.01	0.92	0.00	
FGRAMPH1_01G27657					related to phospholipid-translocating atpase	Katalytische Aktivität	TMhelix	0.10	0.88	-1.28	0.00	-0.63	0.43	1.26	0.01	2.03	0.00	-0.36	0.42	1.56	0.00	
FGRAMPH1_01G27335	C55			13	Amidase signature domain	Katalytische Aktivität	0	-0.07	0.91	-0.25	0.70	-0.51	0.43	1.00	0.00	1.30	0.00	0.86	0.00	0.87	0.01	
FGRAMPH1_01G27341					antibiotic biosynthesis monooxygenase	Katalytische Aktivität	0	0.34	0.25	-0.15	0.88	0.14	0.84	1.04	0.00	0.73	0.00	0.48	0.16	0.53	0.08	
FGRAMPH1_01G27345					hypothetical protein	Unbekannte Funktion	0	0.16	0.78	-0.36	0.61	-0.49	0.46	1.10	0.00	1.57	0.00	0.46	0.35	0.73	0.17	
FGRAMPH1_01G27229	C56			6	hypothetical protein	Unbekannte Funktion	0	-0.10	0.81	0.09	0.95	-0.35	0.63	-1.31	0.00	-1.13	0.00	-1.10	0.00	-1.34	0.00	
FGRAMPH1_01G27231					cytochrome b5 reductase 4	Katalytische Aktivität	0	0.35	0.12	0.14	0.86	0.12	0.85	-0.60	0.00	-0.69	0.00	-0.80	0.00	-0.89	0.00	
FGRAMPH1_01G07269	C58			9	hypothetical protein	Unbekannte Funktion	TMhelix	-0.07	0.87	0.61	0.25	0.31	0.65	0.69	0.02	0.54	0.18	1.43	0.00	1.02	0.00	
FGRAMPH1_01G07275					peroxisomal membrane protein pex29		TMhelix	0.21	0.43	0.16	0.80	0.12	0.85	-0.44	0.04	-0.41	0.05	-0.49	0.01	-0.49	0.05	
FGRAMPH1_01G07279					MFS	Transporter Aktivität	TMhelix	-0.01	0.99	0.60	0.41	-0.04	0.98	-3.08	0.00	-1.96	0.00	-1.81	0.00	-1.80	0.00	
FGRAMPH1_01G07283					cell division control protein 14	Katalytische Aktivität	0	-0.22	0.49	-0.08	0.96	-0.26	0.67	0.62	0.02	0.85	0.00	0.73	0.02	0.81	0.00	
FGRAMPH1_01G07973	C59			15	actin-like protein		0	0.02	0.95	-0.35	0.25	-0.19	0.64	0.33	0.04	0.34	0.02	-0.05	0.87	0.12	0.72	
FGRAMPH1_01G07975					hypothetical protein FPSE_07398	Unbekannte Funktion	0	-0.18	0.74	0.36	0.53	-0.01	0.99	-1.25	0.00	-1.98	0.00	-0.61	0.14	-1.70	0.00	
FGRAMPH1_01G07977					mannan endo- -alpha-mannosidase dcw1	Katalytische Aktivität	TMhelix	0.23	0.24	0.17	0.69	0.09	0.87	-0.40	0.01	-0.30	0.15	-0.45	0.01	-0.43	0.01	
FGRAMPH1_01G07979					Endoplasmic reticulum vesicle transporter; er-derived vesicles protein 41	Transporter Aktivität	0	0.42	0.25	-0.58	0.02	-0.46	0.35	1.03	0.00	1.13	0.00	-0.05	0.92	0.15	0.79	
FGRAMPH1_01G07987					Oxoglutarate/iron-dependent dioxygenase	Katalytische Aktivität	0	0.49	0.31	-0.52	0.38	-0.61	0.38	1.47	0.00	1.93	0.00	0.24	0.68	0.55	0.36	
FGRAMPH1_01G07991					hypothetical protein	Unbekannte Funktion	0	-0.20	0.75	-0.59	0.40	-0.80	0.21	0.90	0.03	1.33	0.00	0.35	0.60	0.56	0.40	
FGRAMPH1_01G07997					Glyoxalase/fofosomycin resistance/dioxygenase domain	Katalytische Aktivität	0	-0.10	0.84	-0.65	0.10	-0.64	0.21	1.33	0.00	1.32	0.00	0.72	0.01	0.70	0.07	
FGRAMPH1_01G08181	C60			7	hypothetical protein	Unbekannte Funktion	TMhelix	0.36	0.47	-0.23	0.82	-0.43	0.23	0.95	0.00	0.97	0.00	0.23	0.69	0.07	0.92	
FGRAMPH1_01G08171					GTP cyclohydrolase 1 type 2/Nif3	Katalytische Aktivität	0	0.32	0.49	-0.32	0.65	-0.01	0.99	0.75	0.02	0.82	0.02	0.03	0.96	0.44	0.33	

Gen ID	Cluster_ID	azr1 ^{S368Y}	Δ azr1	Anzahl an Genen/Cluster	Annotation	Funktionelle Beschreibung/ GoTerm Bezeichnung	TMhelix	NRRL / NRRL log2FC			Δ azr1 -1 / Δ azr1 -1 log2FC			Δ azr1 -2 / Δ azr1 -2 log2FC			NRRL / Δ azr1 -1 log2FC			NRRL / Δ azr1 -2 log2FC		
								pAdjusted			pAdjusted			pAdjusted			pAdjusted			pAdjusted		
FGRAMPH1_01G08369	C61			8	hypothetical protein	Unbekannte Funktion	0	0.28	0.56	-0.64	0.14	-0.04	0.98	2.24	0.00	1.71	0.00	1.17	0.00	1.42	0.00	
FGRAMPH1_01G08371					hypothetical protein	Unbekannte Funktion	0	0.29	NA	-0.14	0.94	-0.28	0.81	1.81	0.00	1.96	0.00	0.93	0.13	0.91	0.23	
FGRAMPH1_01G08377					Serine hydrolase FSH	Katalytische Aktivität	0	0.47	0.37	-0.37	0.67	-0.44	0.59	1.93	0.00	1.28	0.01	0.73	0.18	0.13	0.88	
FGRAMPH1_01G08519	C62			11	short-chain dehydrogenase reductase family protein	Katalytische Aktivität	0	-0.15	0.74	-0.65	0.09	-0.34	0.67	0.94	0.00	1.17	0.00	0.39	0.29	0.88	0.05	
FGRAMPH1_01G08523					cytochrome p450	Cytochrome P450	TMhelix	-0.76	0.03	-0.42	0.56	0.46	0.61	0.73	0.02	0.73	0.14	1.01	0.01	2.11	0.00	
FGRAMPH1_01G08525					cytochrome p450	Cytochrome P450	TMhelix	-0.40	NA	-0.84	0.12	0.26	0.80	1.50	0.00	1.13	0.06	1.25	0.03	2.19	0.00	
FGRAMPH1_01G08527					fad linked oxidase-like protein	Katalytische Aktivität	0	-0.71	0.09	-0.67	0.11	0.13	0.93	0.71	0.06	0.80	0.16	0.83	0.01	1.84	0.00	
FGRAMPH1_01G08529					fad-binding partial		TMhelix	-0.54	0.31	-0.81	0.12	0.13	0.93	1.84	0.00	2.02	0.00	1.61	0.00	2.86	0.00	
FGRAMPH1_01G08531					family protein	Katalytische Aktivität	TMhelix	-0.36	0.52	-0.30	0.75	0.21	0.86	1.57	0.00	1.80	0.00	1.68	0.00	2.76	0.00	
FGRAMPH1_01G21061	C63			4	ferric reductase transmembrane component 5	Katalytische Aktivität	TMhelix	-0.02	0.97	-0.62	0.28	-0.20	0.80	0.86	0.03	1.09	0.00	0.15	0.80	0.91	0.01	
FGRAMPH1_01G21059					MFS siderophore iron transporter 3	Transporter Aktivität	TMhelix	-0.25	0.70	0.26	0.81	0.14	0.91	0.48	0.46	1.14	0.06	1.26	0.01	1.93	0.00	
FGRAMPH1_01G21051					c2h2 zinc finger transcription factor	Transkriptions regulatorische Aktivität	0	-0.78	0.07	-0.03	0.99	1.15	0.00	0.81	0.02	-1.05	0.00	1.62	0.00	1.10	0.01	
FGRAMPH1_01G21041					dipeptidyl peptidase iii	Katalytische Aktivität	0	0.14	0.76	-0.52	0.36	-0.74	0.01	1.06	0.00	0.94	0.00	0.34	0.36	0.03	0.95	
FGRAMPH1_01G21039					hypothetical protein	Unbekannte Funktion	0	0.30	0.47	-0.68	0.05	-0.70	0.00	1.68	0.00	1.74	0.00	0.57	0.13	0.66	0.06	
FGRAMPH1_01G21037					hypothetical protein	Unbekannte Funktion	0	0.42	0.25	-0.33	0.75	-0.20	0.77	1.17	0.00	0.82	0.00	0.30	0.58	0.14	0.76	
FGRAMPH1_01G21035					related to amidases	Katalytische Aktivität	0	0.55	0.03	-0.08	0.93	0.16	0.82	0.76	0.00	0.68	0.00	0.08	0.85	0.27	0.51	
FGRAMPH1_01G21029					gnat family family	Katalytische Aktivität	0	0.03	0.95	-0.53	0.22	-0.23	0.71	1.02	0.00	0.69	0.00	0.40	0.21	0.42	0.19	
FGRAMPH1_01G20955	C64			8	nonribosomal peptide synthetase	Katalytische Aktivität	0	0.39	0.44	0.43	0.67	0.04	0.98	-2.20	0.00	-1.13	0.03	-1.88	0.00	-1.48	0.01	
FGRAMPH1_01G20967					ankyrin protein		0	0.16	0.80	0.36	0.75	0.77	0.14	-1.43	0.00	1.16	0.01	-1.16	0.01	1.85	0.00	
FGRAMPH1_01G20829	C65			11	3-beta-hydroxysteroid-delta -isomerase	Katalytische Aktivität	TMhelix	0.88	0.07	3.35	0.00	1.91	0.00	-1.13	0.03	0.40	0.53	0.64	0.06	0.65	0.02	
FGRAMPH1_01G20837					allantoinase	Katalytische Aktivität	0	-0.74	0.04	0.37	0.52	0.09	0.94	-0.67	0.01	-1.15	0.01	0.55	0.17	-0.26	0.63	
FGRAMPH1_01G21963	C66			11	ga4 desaturase	Katalytische Aktivität	0	-0.32	0.59	0.35	0.60	0.88	0.05	-1.57	0.00	-2.64	0.00	-0.49	0.43	-0.99	0.08	
FGRAMPH1_01G15945	C67			7	hypothetical protein FGSG_11562	Katalytische Aktivität	0	0.79	0.11	2.37	0.00	1.18	0.03	-1.28	0.04	0.39	0.62	0.05	0.95	0.55	0.32	
FGRAMPH1_01G15947					Zn(2)-C6 fungal-type DNA-binding domain	Transkriptions regulatorische Aktivität	0	0.54	0.22	0.84	0.03	0.78	0.00	0.50	0.26	1.29	0.00	0.81	0.01	1.49	0.00	
FGRAMPH1_01G15949					udp- transferase	Katalytische Aktivität	0	1.33	0.00	2.88	0.00	1.91	0.00	-1.66	0.01	0.36	0.57	0.57	0.23	0.96	0.04	
FGRAMPH1_01G08345	C68			18	related to ahmp1 protein		TMhelix	-0.01	0.98	0.56	0.39	-0.05	0.96	-0.87	0.01	-0.65	0.01	-0.16	0.76	-0.67	0.02	
FGRAMPH1_01G24299	C69			18	Leucine-rich repeat		0	0.24	0.39	-0.02	0.99	-0.12	0.76	0.42	0.04	0.86	0.00	0.15	0.55	0.49	0.01	
FGRAMPH1_01G24285					Zn(2)-C6 fungal-type DNA-binding domain	Transkriptions regulatorische Aktivität	0	0.42	0.17	-0.41	0.65	-0.43	0.50	-0.20	0.64	0.12	0.76	-1.09	0.01	-0.80	0.03	

Tabelle E 5: Liste der Transkriptgehalte der Ergosterolbiosynthesegene in den *azr1^{S368Y}* Mutanten, den *Δazr1* Mutanten und dem Wildtyp.

In der Tabelle sind der Genname und die Gen ID, die log2FC Werte in den *azr1^{S368Y}* Mutanten, den *Δazr1* Mutanten und des Wildtyps, sowie eine Beschreibung der Funktion jedes Ergosterolbiosynthesegens angegeben.

Ergosterolbiosynthesegen	Gen_ID	FGSG_ID	Wildtyp						Δ <i>azr1</i>						Beschreibung
			NRRL	pAdjusted	<i>azr1^{S368Y}-1</i>	pAdjusted	<i>azr1^{S368Y}-2</i>	pAdjusted	NRRL	pAdjusted	<i>Δazr1-1</i>	pAdjusted	<i>Δazr1-2</i>	pAdjusted	
<i>ERG1</i>	FGRAMPH1_01G19781	FGSG_06215	1.41	0.00	1.04	0.00	0.75	0.07	0.22	0.65	1.52	0.00	0.87	0.02	Squalene epoxidase; catalyzes the epoxidation of squalene to 2,3-oxidosqualene; plays an essential role in the ergosterol-biosynthesis pathway and is the specific target of the antifungal drug terbinafine
<i>ERG2</i>	FGRAMPH1_01G24501	FGSG_07315	1.43	0.00	0.91	0.00	0.80	0.00	0.72	0.06	1.30	0.00	1.26	0.00	C-8 sterol isomerase; catalyzes isomerization of delta-8 double bond to delta-7 position at an intermediate step in ergosterol biosynthesis; transcriptionally down-regulated when ergosterol is in excess
<i>ERG3</i>	FGRAMPH1_01G06005	FGSG_02502	0.87	0.04	0.91	0.00	0.47	0.14	0.67	0.03	1.05	0.00	0.79	0.02	C-5 sterol desaturase; glycoprotein that catalyzes the introduction of a C-5(6) double bond into episterol, a precursor in ergosterol biosynthesis; transcriptionally down-regulated when ergosterol is in excess
<i>ERG3</i>	FGRAMPH1_01G16829	FGSG_04994	1.00	0.01	0.61	0.23	0.70	0.15	0.81	0.01	1.23	0.00	1.02	0.00	
<i>ERG4</i>	FGRAMPH1_01G07045	FGSG_10003	0.70	0.31	0.22	0.67	0.51	0.45	0.46	0.32	0.89	0.02	0.92	0.00	C-24(28) sterol reductase; catalyzes the final step in ergosterol biosynthesis
<i>ERG5</i>	FGRAMPH1_01G04729	FGSG_01959	1.08	0.02	1.22	0.00	1.05	0.00	0.32	0.56	1.16	0.00	1.04	0.00	C-22 sterol desaturase; a cytochrome P450 enzyme that catalyzes the formation of the C-22(23) double bond in the sterol side chain in ergosterol biosynthesis
<i>ERG5</i>	FGRAMPH1_01G13463	FGSG_03686	0.15	0.90	0.39	0.40	0.37	0.57	0.07	0.93	0.25	0.86	0.01	0.99	
<i>ERG6</i>	FGRAMPH1_01G11303	FGSG_02783	2.11	0.00	2.00	0.00	2.01	0.00	0.85	0.05	2.19	0.00	1.35	0.00	Delta(24)-sterol C-methyltransferase; converts zymosterol to fecosterol in the ergosterol biosynthetic pathway by methylating position C-24; localized to lipid particles, the plasma membrane-associated endoplasmic reticulum, and the mitochondrial outer membrane
<i>ERG6</i>	FGRAMPH1_01G18649	FGSG_05740	2.54	0.00	3.62	0.00	6.85	0.00	0.78	0.07	4.83	0.00	2.76	0.00	
<i>ERG7</i>	FGRAMPH1_01G19145	FGSG_05950	1.07	0.00	0.90	0.00	0.72	0.00	0.71	0.01	1.27	0.00	1.02	0.00	Lanosterol synthase; an essential enzyme that catalyzes the cyclization of squalene 2,3-epoxide
<i>ERG8</i>	FGRAMPH1_01G26385	FGSG_09764	1.10	0.00	1.44	0.00	1.46	0.00	1.08	0.00	1.35	0.00	1.50	0.00	Phosphomevalonate kinase; an essential cytosolic enzyme that acts in the biosynthesis of isoprenoids and sterols, including ergosterol
<i>ERG9</i>	FGRAMPH1_01G27225	FGSG_09381	0.36	0.46	0.19	0.48	0.23	0.50	0.40	0.32	0.43	0.38	0.44	0.18	Farnesyl-diphosphate farnesyl transferase (squalene synthase); joins two farnesyl pyrophosphate moieties to form squalene in the sterol biosynthesis pathway
<i>ERG10</i>	FGRAMPH1_01G27377	FGSG_09321	1.55	0.00	1.09	0.00	1.33	0.00	0.85	0.06	1.90	0.00	1.46	0.00	Acetyl-CoA C-acetyltransferase (acetoacetyl-CoA thiolase); cytosolic enzyme that transfers an acetyl group from one acetyl-CoA molecule to another, forming acetoacetyl-CoA; involved in the first step in mevalonate biosynthesis
<i>ERG10</i>	FGRAMPH1_01G17069	FGSG_05087	0.39	0.28	0.43	0.28	0.21	0.68	-0.25	0.59	0.24	0.74	0.02	0.99	
<i>ERG11</i> (<i>Cyp51B</i>)	FGRAMPH1_01G02507	FGSG_01000	1.76	0.00	1.93	0.00	1.52	0.00	0.71	0.14	2.02	0.00	1.14	0.00	

Ergosterolbiosyntheseegen	Gen_ID	FGSG_ID	log2FC						log2FC						Beschreibung
			NRRL	pAdjusted	Δ ^{erg2} / Δ ^{erg2} log2FC	pAdjusted	Δ ^{erg2} / Δ ^{erg2} log2FC	pAdjusted	NRRL	pAdjusted	Δ ^{erg2} / Δ ^{erg2} log2FC	pAdjusted	Δ ^{erg2} / Δ ^{erg2} log2FC	pAdjusted	
<i>ERG11 (Cyp51A)</i>	FGRAMPH1_01G14465	FGSG_04092	0.60	0.30	4.21	0.00	3.96	0.00	0.37	0.45	3.30	0.00	1.41	0.00	Lanosterol 14-alpha-demethylase; catalyzes C-14 demethylation of lanosterol to form 4,4''-dimethyl cholesta-8,14,24-triene-3-beta-ol in ergosterol biosynthesis pathway; transcriptionally down-regulated when ergosterol is in excess; member of cytochrome P450 family
<i>ERG11 (Cyp51C)</i>	FGRAMPH1_01G21047	FGSG_11024	0.29	0.71	0.37	0.46	0.14	0.86	0.36	0.49	0.46	0.47	0.24	0.79	
<i>ERG12</i>	FGRAMPH1_01G19063	FGSG_05912	0.55	0.40	0.74	0.03	0.78	0.03	0.29	0.62	0.73	0.07	0.19	0.79	Mevalonate kinase; acts in the biosynthesis of isoprenoids and sterols, including ergosterol, from mevalonate
<i>ERG13</i>	FGRAMPH1_01G27519	FGSG_09266	1.87	0.00	1.33	0.00	1.49	0.00	1.11	0.00	2.05	0.00	1.39	0.00	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) synthase; catalyzes the formation of HMG-CoA from acetyl-CoA and acetoacetyl-CoA; involved in the second step in mevalonate biosynthesis
<i>ERG20</i>	FGRAMPH1_01G23179	FGSG_06784	-0.34	0.47	-0.39	0.38	-0.08	0.92	-0.02	0.97	0.28	0.34	-0.18	0.70	Farnesyl pyrophosphate synthetase; has both dimethylallyltransferase and geranyltransferase activities; catalyzes the formation of C15 farnesyl pyrophosphate units for isoprenoid and sterol biosynthesis
<i>ERG24</i>	FGRAMPH1_01G22691	FGSG_06606	1.08	0.03	0.46	0.47	0.64	0.31	0.78	0.04	0.81	0.04	0.97	0.00	C-14 sterol reductase; acts in ergosterol biosynthesis
<i>ERG24</i>	FGRAMPH1_01G05637	FGSG_02346	1.53	0.00	1.17	0.02	1.48	0.00	0.95	0.02	1.93	0.00	1.63	0.00	
<i>ERG25</i>	FGRAMPH1_01G26177	FGSG_09830	0.94	0.04	0.66	0.07	0.63	0.08	0.75	0.07	1.15	0.00	0.68	0.10	C-4 methyl sterol oxidase; catalyzes the first of three steps required to remove two C-4 methyl groups from an intermediate in ergosterol biosynthesis
<i>ERG26</i>	FGRAMPH1_01G02977	FGSG_01203	0.08	0.91	-0.31	0.33	-0.03	0.97	0.27	0.43	0.23	0.61	0.01	0.99	C-3 sterol dehydrogenase; catalyzes the second of three steps required to remove two C-4 methyl groups from an intermediate in ergosterol biosynthesis
<i>ERG27</i>	FGRAMPH1_01G26961	FGSG_13596	1.26	0.02	1.29	0.00	1.48	0.00	0.79	0.09	1.65	0.00	1.51	0.00	3-keto sterol reductase; catalyzes the last of three steps required to remove two C-4 methyl groups from an intermediate in ergosterol biosynthesis
<i>ERG28</i>	FGRAMPH1_01G18473	FGSG_05669	-0.51	0.30	-0.67	0.05	-0.51	0.36	0.15	0.62	-0.16	0.81	-0.09	0.89	Endoplasmic reticulum membrane protein; may facilitate protein-protein interactions between the Erg26p dehydrogenase and the Erg27p 3-ketoreductase and/or tether these enzymes to the ER, also interacts with Erg6p
<i>HMG1</i>	FGRAMPH1_01G27691	FGSG_09197	0.75	0.10	0.30	0.32	0.35	0.43	0.39	0.34	0.99	0.00	0.42	0.09	HMG-CoA reductase; catalyzes conversion of HMG-CoA to mevalonate, which is a rate-limiting step in sterol biosynthesis
<i>ID11</i>	FGRAMPH1_01G26431	FGSG_09722	0.14	0.80	-0.41	0.47	-0.30	0.66	-0.02	0.96	-0.06	0.97	0.11	0.85	Isopentenyl diphosphate:dimethylallyl diphosphate isomerase; catalyzes an essential activation step in the isoprenoid biosynthetic pathway
<i>MVD1</i>	FGRAMPH1_01G08071	FGSG_10424	0.42	0.40	0.18	0.69	0.57	0.16	0.55	0.18	0.83	0.00	0.83	0.02	Mevalonate pyrophosphate decarboxylase; essential enzyme involved in the biosynthesis of isoprenoids and sterols, including ergosterol
<i>UPC2</i>	FGRAMPH1_01G15947	FGSG_11561	0.68	0.10	0.79	0.01	1.05	0.01	0.54	0.22	0.84	0.03	0.78	0.00	Sterol regulatory element binding protein; induces sterol biosynthetic genes, upon sterol depletion; acts as a sterol sensor, binding ergosterol in sterol rich conditions; relocates from intracellular membranes to perinuclear foci upon sterol depletion
<i>PDR5</i>	FGRAMPH1_01G09633	FGSG_08312	3.57	0.00	4.01	0.00	4.07	0.00	1.47	0.00	2.72	0.00	3.25	0.00	Plasma membrane ATP-binding cassette (ABC) transporter; multidrug transporter actively regulated by Pdr1p; also involved in steroid transport, cation resistance, and cellular detoxification during exponential growth; PDR5 has a paralog, PDR15

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema des Lebenszyklus von <i>Fusarium graminearum</i> .	11
Abbildung 2: Schema des Trichothecen Genclusters.	13
Abbildung 3: Chemische Struktur von 3-ADON, 15-ADON, Nivalenol, Zearalenon, Fusarin C und Aurofusarin.	15
Abbildung 4: Schema der Ergosterolbiosynthese.	20
Abbildung 5: Darstellung der Gen- und Proteinstruktur des Azr1 Transkriptionsfaktors inklusive der Lokalisierung vorhergesagter Domänen (nach EnsemblFungi).	58
Abbildung 6: Azr1 ist innerhalb der Gattung <i>Fusarium</i> stark konserviert und zeigt zusätzlich deutliche Ähnlichkeiten zu den Orthologen von <i>Colletotrichum</i> spp.	59
Abbildung 7: Erzeugung und Überprüfung der erzeugten Mutanten	62
Abbildung 8: Weder die Deletion von <i>AZR1</i> noch der Aminosäureaustausch S368Y beeinflusst die Vitalität der Mutanten	64
Abbildung 9: Die <i>azr1</i> ^{S368Y} Mutanten zeigen volle Virulenz auf Weizen und Mais und gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Virulenz auf Azol-behandelten Weizenähren.	66
Abbildung 10: Die <i>azr1</i> ^{S368Y} Mutanten sind toleranter gegenüber Tebuconazol und Epoxiconazol.	68
Abbildung 11: Die <i>azr1</i> ^{S368Y} Mutanten zeigen Kreuzresistenz gegenüber verschiedenen Azolwirkstoffen.	71
Abbildung 12: Die <i>azr1</i> ^{S368Y} und die Δ <i>azr1</i> Mutanten produzieren <i>in vitro</i> signifikant weniger Zearalenon.	72
Abbildung 13: Das Transkriptom der Δ <i>azr1</i> Mutanten unterscheidet sich deutlich stärker von dem des Wildtypisolates als das der <i>azr1</i> ^{S368Y} Mutanten.	74
Abbildung 14: Sowohl die <i>azr1</i> ^{S368Y} Mutanten als auch die Δ <i>azr1</i> Mutanten zeigen eine sich vom Wildtyp unterscheidende transkriptionelle Antwort auf Fungizid-Stress.	76
Abbildung 15: Die Expression von vielen Genen in SMCs ist sowohl in den <i>azr1</i> ^{S368Y} Mutanten als auch in den Δ <i>azr1</i> Mutanten verändert.	84
Abbildung 16: Visualisierung des Einflusses von Azr1 auf die Transkriptgehalte von Sekundärmetabolit-Clustern anhand von Heatmaps.	88
Abbildung 17: In der Gen-Ontologie Annotation dominieren bei den SMC-Genen der <i>azr1</i> ^{S368Y} Mutanten und der Δ <i>azr1</i> Mutanten drei molekulare Funktionen.	89
Abbildung 18: Anwendung des CAPS Marker Verfahrens zur Testung von Feldisolaten auf das Vorhandensein des SNPs in <i>AZR1</i> .	91
Abbildung E1: Erzeugung und Überprüfung der transgenen Pilzisolat.	139
Abbildung E2: Unterschiedliche Inkubationstemperaturen beeinflussen die Wachstumsraten von Wildtyp und Mutanten in gleichem Maße.	140
Abbildung E3: Unterschiedliche Inkubationstemperaturen beeinflussen die Koloniemorphologie von Wildtyp und Mutanten in gleichem Maße.	141
Abbildung E4: Auf MMA zeigen die Referenzstämme und die Mutanten keine Unterschiede in der Koloniemorphologie und der Wachstumsrate.	142
Abbildung E5: Auf SNA zeigen die Referenzstämme und die Mutanten keine Unterschiede in der Koloniemorphologie und der Wachstumsrate.	143
Abbildung E6: Auf Karotten-Agar zeigen die Referenzstämme und die Mutanten keine Unterschiede in der Koloniemorphologie und der Wachstumsrate.	144
Abbildung E7: Die Hyphendichten des Wildtyps und der Mutanten unterscheiden sich in keiner der Zonen des Myzels.	145
Abbildung E8: Die Morphologie von Makrokonidien und Ascosporen ist in den Mutanten nicht beeinträchtigt.	146

Abbildung E9: Die Makrokonidien der Referenzstämmen und der Mutanten haben ähnliche Keimraten.....	147
Abbildung E10: Alle Mutanten bilden Perithezien und keimfähige Ascosporen.....	148
Abbildung E11: Die Virulenz an Weizenähren unterscheidet sich nicht zwischen Mutanten und Referenzstämmen.....	149
Abbildung E12: Die Virulenz an verwundeten Maisstängeln unterscheidet sich nicht zwischen Mutanten und Referenzstämmen.....	150
Abbildung E13: Die <i>azr1</i> ^{S368Y} Mutanten tolerieren höhere Tebuconazolkonzentrationen als der Wildtyp.....	151
Abbildung E14: Die <i>azr1</i> ^{S368Y} Mutanten tolerieren höhere Epoxiconazolkonzentrationen als der Wildtyp.....	152
Abbildung E15: Fungizide mit anderen molekularen Wirkorten als dem der DMI-Fungizide inhibieren weder die Referenzstämmen noch die Mutanten.....	153

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die ED90- Werte der <i>azr1</i> ^{S368Y} Mutanten liegen deutlich über denen des Wildtyps.....	69
Tabelle 2: Die Expression von Sekundärmetabolit-Genen ist sowohl in den <i>azr1</i> ^{S368Y} Mutanten als auch in den Δ <i>azr1</i> Mutanten beeinträchtigt.....	85
Tabelle E1: Liste aller DEGs der <i>azr1</i> ^{S368Y} Mutanten unter Anwendung eines log2FC von ≥ 1	154
Tabelle E2: Liste aller DEGs der Δ <i>azr1</i> Mutanten bei Anwendung eines log2FC von ≥ 1 bzw. 1,5.	157
Tabelle E3: Liste aller signifikant deregulierten SMC-Gene in den <i>azr1</i> ^{S368Y} Mutanten und dem Wildtyp.....	166
Tabelle E4: Liste aller signifikant deregulierten SMC-Gene in den Δ <i>azr1</i> Mutanten und dem Wildtyp.	168
Tabelle E5: Liste der Transkriptgehalte der Ergosterolbiosynthesegene in den <i>azr1</i> ^{S368Y} Mutanten, den Δ <i>azr1</i> Mutanten und dem Wildtyp.	174
Tabelle E6: Liste der Transkriptgehalte von <i>AZR1</i> und dessen Nachbarn in den <i>azr1</i> ^{S368Y} Mutanten, den Δ <i>azr1</i> Mutanten und dem Wildtyp.	176

8.4 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von der Firma Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE) bezogen. Auf die Bezugsquellen von Enzymen und Reagenzien für die molekularbiologischen Arbeiten wird im Text verwiesen. Die Oligonukleotid-Synthese wurde von der Firma biomers.net GmbH (Ulm) durchgeführt. Primer für qRT-PCR Reaktionen wurden bei der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, DE) gekauft. Über die Firma B. Heinemann (Duderstadt, DE) wurden sämtliche Verbrauchsmaterialien bezogen.

8.4.1 Nährmedien

Hefeextrakt Kartoffeldextrose Medium (*Yeast Extract Potato Dextrose* = YEPD)

Teil A:

- 3 g Hefeextrakt
- 10 g Trypto-Pepton
- ad 950 ml H₂O_{dest}
- Das Medium wurde für 23 Minuten bei 121°C autoklaviert

Teil B:

- 20 g Glucose
- ad 50 ml H₂O_{dest}
- Das Medium wurde für 23 Minuten bei 121°C autoklaviert

Teil A und B wurden nach dem Autoklavieren steril vereint.

Karotten-Agar (KA)

400 g Bio-Möhren wurden geschält, in kleine Stücke geschnitten und zusammen mit 400 ml H₂O_{dest} in einer ein Liter Blaukappflasche für 20 Minuten autoklaviert (121 °C). Danach wurde der Ansatz mit einem Mixer zerkleinert, mit weiteren 500 ml H₂O_{dest} und 20 g Agar-Agar versetzt und für 30 Minuten autoklaviert (121 °C).

Kartoffel-Dextrose-Agar (*Potato Dextrose Agar* = PDA)

- 12 g PDA (Difco)
- 7,5 g Agar-Agar
- ad 500 ml H₂O_{dest}
- Das Medium wurde für 23 Minuten bei 121°C autoklaviert

Nach Bedarf wurde dem Medium, nach dem Abkühlen auf unter 60 °C, ein Antibiotikum in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben. In Anhängigkeit von der verwendeten Resistenzkassette wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Antibiotika verwendet: Hygromycin B (Invivogen, San Diego,

USA) und Nourseothricin (Werner BioAgents, Jena). Für die Herstellung von PD-Flüssigmedium wurde der Agar-Agar weggelassen und ansonsten wie oben beschrieben verfahren.

LB-Medium (*Lysogeny Broth* = LB)

- 10 g Bacto-Trypton
- 5 g Hefeextrakt
- 10 g Natriumchlorid
- ad 1000 ml H₂O_{dest}
- Das Medium wurde für 23 Minuten bei 121°C autoklaviert

Um LB-AgarPetrischalen herzustellen, wurden vor dem Autoklavieren zusätzlich 15 g/l Agar-Agar hinzugefügt. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf etwa 60 °C konnte dem Medium zur selektiven Kultivierung von Bakterien das Antibiotikum Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt werden.

Mungobohnen-Medium (*Mung Bean Broth* = MBB)

20 g gekaufte Bio-Mungobohnen wurden in 1 Liter kochendes H₂O_{VE} geschüttet und für 5 Minuten gekocht. Danach wurde der Topf für weitere 15 Minuten stehen gelassen. Der Überstand des Topfinhaltes wurde in eine Blaukappflasche gefüllt und für 23 Minuten autoklaviert (121 °C).

Minimalmedium (MM)

- 17,2 g Saccharose
- 10 ml Stammlösung A (siehe 3.3.2)
- 10 ml Stammlösung B (siehe 3.3.2)
- 15 g Agar-Agar
- ad 1000 ml H₂O_{dest}
- Das Medium wurde für 23 Minuten bei 121°C autoklaviert

Regenerationsmedium (RM)

Teil A:

- 0,5 g Hefeextrakt
- 0,5 g Caseinhydrolysat
- 5 g Agar-Agar
- ad 500 ml H₂O_{dest}
- Das Medium wurde für 23 Minuten bei 121°C autoklaviert

Teil B:

- 275 g Saccharose
- ad 500 ml H₂O_{dest}
- hierfür eine 1 Liter Blaukappflasche verwenden
- Das Medium wurde für 23 Minuten bei 121°C autoklaviert

Teil A und B wurden nach dem Autoklavieren steril vereint und auf 250 ml Blaukappflaschen verteilt. Nach dem Abkühlen der Lösung auf unter 60 °C konnte einem Teil des Mediums 200 µl des benötigten Antibiotikums pro 100 ml Medium hinzugegeben werden, wodurch sich im Rahmen des Transformationsprotokolls nach den Diffusionsvorgängen im Agar eine Endkonzentration von 100 µg/ml einstellte.

SDB-Medium (Sabouraud Dextrose Broth = SDB)

- 30 g Sabouraud Glucose Broth
- ad 1000 ml H₂O_{dest}
- Sterilfiltration durch einen 0,20 µm Millex-HA Filter (Millipore, Schwalbach)

Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA)

- 1 g KH₂PO₄
- 1 g KNO₃
- 0,5 g MgSO₄ x 7H₂O
- 0,5 g KCl
- 0,2 g Glucose
- 0,2 g Saccharose
- 15 g Agar-Agar
- ad 1000 ml H₂O_{dest}
- Das Medium wurde für 23 Minuten bei 121°C autoklaviert

Nach Bedarf wurde dem Medium, nach dem Abkühlen auf unter 60 °C, das entsprechende Antibiotikum in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben.

8.4.2 Puffer und Lösungen

0,25 x Waschlösung

- 0,25x SSC-Transferpuffer
- 0,1 % (w/v) SDS

0,5 x Waschlösung

- 0,5x SSC-Transferpuffer
- 0,1 % (w/v) SDS

1 x Blockingpuffer

10 g Blockingreagenzpulver (Roche Diagnostics, Mannheim, DE) wurden in 100 ml Maleinsäurepuffer (s. u.) zum Lösen erhitzt und schließlich für 20 min autoklaviert (121 °C). Davon ausgehend wurde eine 1:10 Verdünnung mit Maleinsäurepuffer hergestellt.

1 x TAE-Puffer

- 40 mM Tris-HCl, pH 8,3
- 20 mM Natriumacetat
- 2 mM EDTA

2 x Waschlösung

- 2x SSC-Transferpuffer
- 0,1 % (w/v) SDS

20 x SSC-Transferpuffer

- 3 M NaCl
- 0,3 M Natriumcitrat
- pH 7,5

6 x DNA-Probenpuffer

- 33 % (v/v) Glycerin, 66 % (v/v) 10 x TAE-Puffer
- 0,75 mg/ml Orange G, 0,03 mg/ml Xylen Cyanol

Ampicillin-Stammlösung

- 100 mg/ml Ampicillin (Sigma, St. Gallen, CH) in H₂O_{Bidest}
- Die Lösung wurde sterilfiltriert (0,20 µm Millex-HA Filter, Millipore, Schwalbach, DE)

Breaking Buffer-Puffer

- 2 % (v/v) Triton X 100
- 1 % (w/v) SDS
- 100 mM NaCl
- 10 mM Tris-HCl (M= 121,14 g/mol), pH 8,0
- 1 mM EDTA, pH 8,0

Denaturierungslösung

- 0,4 M NaOH

Depurinierungslösung

- 0,25 M HCl

Detektionspuffer

- 100 mM NaCl
- 100 mM Tris-HCl, pH 9,5

DNA-Extraktionspuffer I

- 7 M Harnstoff
- 2 % (w/v) SDS
- 5 mM EDTA, pH 8,0

DNA-Extraktionspuffer II

- 150 mM NaCl
- 5 mM EDTA, pH 8,0
- 50 mM Tris-HCl, pH 8,0

Hybridisierungspuffer

- 5 ml 20x SSC-Transferpuffer
- 2 ml 1 % N-Lauroyl-sarcosin
- 20 µl 20 % SDS
- 2 ml 10x Blockingpuffer
- 11 ml H₂O_{dest}

Hygromycin-Stammlösung

- 100 mg/ml Hygromycin B (Invivogen, San Diego, USA) in H₂O_{Bidest}
- Die Lösung wurde sterilfiltriert (0,20 µm Millex-HA Filter, Millipore, Schwalbach, DE)

Nourseothricin-Stammlösung

- 100 mg/ml Nourseothricin (Werner BioAgents, Jena, DE) in H₂O_{Bidest}
- Die Lösung wurde sterilfiltriert (0,20 µm Millex-HA Filter, Millipore, Schwalbach, DE)

Maleinsäurepuffer

- 0,1 M Maleinsäure, pH 7,5
- 0,15 M NaCl

Methylenblau-Färbelösung (0,01 %)

- 0,02 g Methylenblau
- ad 200 ml 1x TAE-Puffer

PEG-Lösung

- 30 g PEG 8000 (30 % (w/v))
- 10 mM Tris-HCl, pH 8
- 0,5 mM CaCl₂
- ad 100 ml H₂O_{dest}
- Die Lösung wurde sterilfiltriert (0,45 µm Millex-HA Filter, Millipore, Schwalbach, DE)

Protoplastierungs-Mix

- 500 mg Driselase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)
- 1 mg Chitinase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)
- 100 mg Lyseenzym von *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)
- ad 20 ml 1,2 M KCl
- für 30 min langsam rühren
- Die Lösung wurde sterilfiltriert (0,45 µm Millex-HA Filter, Millipore, Schwalbach, DE)

Stammlösung A

- 50 g Ca(NO₃)₂
- ad 500 ml H₂O_{Bidest}
- Die Lösung wurde für 23 Minuten bei 121°C autoklaviert

Stammlösung B

- 10 g KH₂PO₃
- 12,5 g Mg₂SO₄ x 7 H₂O
- 2,7 g NaCl
- ad 500 ml H₂O_{Bidest}
- Die Lösung wurde für 23 Minuten bei 121°C autoklaviert

STC-Puffer

- 1,2 M Sorbitol
- 50 mM CaCl₂
- 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
- ad 500 ml H₂O_{dest}
- Der Puffer wurde für 23 Minuten bei 121°C autoklaviert

Transformation & Storage Solution (TSS)

- 10 g Trypton
- 5 g Hefeextrakt
- 0,17 M NaCl
- 20 mM MgCl₂
- 20 mM MgSO₄
- 10 % (w/v) PEG 4000
- nach dem Autoklavieren 5 % (v/v) Dimethylsulfoxid (steril filtriert) hinzugeben

Waschpuffer M

- 150 mM NaCl
- 100 mM Maleinsäure, pH 7,5
- 0,3 % (v/v) Tween20

8.4.3 Vektoren

pJET2.1/blunt (Fermentas, St. Leon-Rot, DE)

Das Plasmid pJET2.1/blunt wurde für die Klonierung von PCR-Produkten in *E. coli* verwendet. Durch das im Polylinker vorhandene „Selbstmordgen“ *eco47IR* sind nur Transformanten mit Insertionen lebensfähig. Das ebenfalls vorhandene Resistenzgen für Ampicillin, das β -Lactamase Gen (*bla*) aus *E. coli*, erlaubt die Selektion von Transformationsereignissen.

pAN7-1 (Punt et al., 1987)

Unter der Kontrolle des *Aspergillus nidulans* *gpdA*-Promoters und des *A. nidulans* *trpC* Terminators enthält pAN7-1 das Hygromycin-B-Phosphotransferase-Gen (*hph*) aus *E. coli*. Zusätzlich verfügt es über das Ampicillin-Resistenzgen. Auf diese Weise wird Resistenz gegenüber Ampicillin in *E. coli* und Hygromycin B in Pilzen vermittelt.

pNR1 (Malonek et al., 2004)

Unter der Kontrolle des *Aspergillus nidulans* *oliC*-Promoters und des *Botrytis cinereas tubA* Terminators enthält das pNR1 Plasmid das Nourseothricin N-acetyltransferase 1 Gen (*nat1*) aus *Streptomyces noursei*. Zusätzlich verfügt es über das Resistenzgen für Ampicillin, das β -lactamase Gen (*bla*) aus *E. coli*. Auf diese Art und Weise wird Resistenz gegenüber Ampicillin in *E. coli* und Nourseothricin in Pilzen vermittelt, wodurch es sich bei diesem Plasmid wie bei pAN7-1 um einen sogenannten „shuttle vector“ handelt.

8.4.4 Oligonukleotide

Name des Primers	Sequenz von 5' nach 3'
------------------	------------------------

Universal-Überhänge zur Verwendung von Resistenzkassetten:

uni-hyg.F1	TGTACGACTGTCAGTTGCACTGACCGGTGCCTGGATCTTC
uni-hyg.R1	AAGCTAGTGAGACTCCAGACGGTCGGCATCTACTCTATTCC
uni-nours.F1	TGTACGACTGTCAGTTGCACATTCGGGCCGGATTG
uni-nours.R1	AAGCTAGTGAGACTCCAGACACCGATGAAACGATTCTCAAC

Erzeugung des Deletionskonstruktes und der Hybridisiersonde von $\Delta azr1$:

Del-AZR1-P-F1	GGAATCAGCCAGTTCGTAGAG
Del-AZR1-P-R1	GTGCAACTGACAGTCGTACAGTTGGATGAATAGTTACAGGTGG
Del-AZR1-T-F1	GTCTGGAGTCTCACTAGCTTATGGGTGCAGAGAAAATACAATGG
Del-AZR1-T-R1	AACCATGGCAGAAACATCCAAGC
Del-Nested-AZR1-F1	TGACGTGCTTCCCAGCATTC
Del-Nested-AZR1-R1	GTACTGATCCATGGCCTCTTC
Sonde-Del-AZR1-F1	TGTGACATCCATTTACTGGACAAAG
Sonde-Del-AZR1-R1	CGATAAGCCCTGACTACCTTG

Sequenzierung von $\Delta azr1$:

Seq-Del-AZR1-F1	CGAGACTATTACCCGTTTCG
Seq-Del-AZR1-F4	CAGCCTTCCAGACGCTAAAC
Seq-Del-AZR1-R1	GGCTGGAGTCTTCCGTTCCAC
Seq-Del-AZR1-R4	GAGACCGACTGTTCACACTACG
SNP.P1.AllelAZR1.F1	TTCTTCCGCATGTCCTCCAC
SNP.P1.AllelAZR1.F1.2	TCGCAATAGATCTCGGTTGG
SNP.P1.AllelAZR1.R1	GCGAACCATGGCAGAAACATC

Sonde-Del-AZR1-R1	CGATAAGCCCTGACTACCTTG
Nours_F02	CTCTTGACGACACGGCTTAC
Del-AZR1-T-R1	AACCATGGCAGAAACATCCAAGC

Erzeugung der Konstrukte und der Hybridisiersonde von *azr1*^{S368Y}, *azr1*^{controlN}, *azr1*^{controlP}:

Allel-AZR1-P-F1	GGAATCAGCCAGTTCGTAGAG
Allel-AZR1-P-R1	GTTGGATGAATAGTTACAGGTGG
Allel-AZR1-ORF-F1	CCACCTGTAACTATTCATCCAAC
Allel-AZR1-ORF-R1	CTTGACAGCTCGTCCATGCTCACCAGCCACTGGCGTTG
Allel-AZR1-Tnos-F1	ACAACGCCAGTGGCTGGTGAGCATGGACGAGCTGTACAAG
Allel-AZR1-Tnos-R1	CAACCATGATCTGGACAGATCATCGATGAATTCTCATGTTTGACAGC
Allel-AZR1-PgpdA-F1	AACATGAGAATTCATCGATGATCTGTCCAGATCATGGTTGACC
Allel-AZR1-hph-R1	TTGTATTTCTCTGCACCCATCTATTCCTTTGCCCTCGGAC
Allel-AZR1-T-F1	GTCCGAGGGCAAAGGAATAGATGGGTGCAGAGAAATACAATGG
Allel-AZR1-T-R1	CGAACCATGGCAGAAACATCC
Allel-Nested-AZR1-F1	TGACGTGCTTCCCAGCATTCC
Allel-Nested-AZR1-R1	GTACTGATCCATGGCCTCTTC
Sonde-Allel-AZR1-F1	GGCGTATATGCTCCGCATTG
Sonde-Allel-AZR1-R1	AGCCATCCATGGCTGGAATC

Sequenzierung von *azr1*^{S368Y}, *azr1*^{controlN}, *azr1*^{controlP}:

Seq-Allel-AZR1-F1	CGAGACTATTACCCGTTTCG
Seq-Allel-AZR1-F2	GGGAACCATCCACGATAACG
Seq-Allel-AZR1-F3	CGGCCACTGTGTCTACTAAC
Seq-Allel-AZR1-F4	CACTCTTTCTCCGCCCTCAC
Seq-Allel-AZR1-F5	ATTGGCCCATCCGGCATCTG
Seq-Allel-AZR1-F6	CTCTCGGAGGGCGAAGAATC
Seq-Allel-AZR1-F7	ACGGACAATGGCCGCATAAC
Seq-Allel-AZR1-F8	CAGCCTTCCAGACGCTAAAC
Seq-Allel-AZR1-R1	ATTGGCTATTGCGGGAGACC
Seq-Allel-AZR1-R2	CGCCATGTAGTGTATTGACC
Seq-Allel-AZR1-R3	GATGGGAAGGATGGAGTATG
Seq-Allel-AZR1-R4	TCGCTTACTGCCGGTGATTC
Seq-Allel-AZR1-R5	GAGCGAGCCAGATACGAAAG

Seq-Allel-AZR1-R6	TCCCGGACGTTGCTGCATAC
Seq-Allel-AZR1-R7	GAAGTAGGTCGTCGTCTTCG
Seq-Allel-AZR1-R8	CCATGCCGTCATCAAGATAC
SeqAllelAZR1.800.F1	ATGACGGCAAGTCCAAGAGG
SeqAllelAZR1.800.F2	GGCGTGTACTTACTGCCAAC
SeqAllelAZR1.800.R1	GCTGCATACATGGAGTCAAG
SeqAllelAZR1.800.R2	GAAATCGGGTTCGAGAATCC
SeqAllelAZR1.800.R3	CGGCCGAAATTACCGATTAC
SeqAllelAZR1.800.R4	TGCCAGTGGCTTATTACTC
Sonde_Hyg_F1	TGACCGGTGCCTGGATCTTC
Sonde_Hyg_R1	GGGCGTCGGTTTCCACTATC
Seq.SNP.P1.AllelAZR1.F1	ATGGTACACGGCCCTAGCAC
Seq.SNP.P1.AllelAZR1.R1	CGTTGTGAGCGAGCCAGATAC
SNP.P1.AllelAZR1.F1	TTCTCCGCATGTCCTCCAC
SNP.P1.AllelAZR1.F1.2	TCGCAATAGATCTCGGTTGG
SNP.P1.AllelAZR1.F2	AGATGCGCCATATCCTCGAC
SNP.P1.AllelAZR1.R1	GCGAACCATGGCAGAAACATC
SNP.P1.AllelAZR1.R2	GTCCAGCCTGCAACAATTCC

Nachweis von *azr1*^{S368Y} mittels CAPS Marker:

Seq.SNP.P1.AllelAZR1.F1	ATGGTACACGGCCCTAGCAC
Seq.SNP.P1.AllelAZR1.R1	CGTTGTGAGCGAGCCAGATAC

Primer für RT- und qRT-PCR:

Cof.FG06245.F1	TGTCATTGGCCTGCAACTCGGT
Cof.FG06245.R1	ACGACTTCGAGTACAACCTGGCCT

8.5 Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ad	lat.: zu
ADON	acetyldeoxynivalenol
amp	Ampicillin
AT	Österreich
Bidest	zweifach destilliert
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaar
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAPS	<i>Cleaved Amplified Polymorphic Sequences</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cm	Zentimeter
CSPD	Chemilumineszentes Substrat für eine Phosphat Detektion
CYP51	cytochrome p450 14 α -sterol demethylase
d	Tag(e)
DE	Deutschland
dest	einfach destilliert
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIG	dUTP Digoxigenin markiertes Desoxyuridintriphosphat
DJ-PCR	<i>double joint</i> – PCR
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DMI	<i>Demethylase inhibitors</i>
DON	Deoxynivalenol
dpi	<i>days past inoculation</i> (Anzahl der Tage nach der Inokulation)
dsDNA	Doppelstrang-DNA
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC50	<i>effective concentration to suppress 50 % of population</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , lat.: und andere
F.g.	<i>Fusarium graminearum</i>
FGSG	<i>Fusarium graminearum species complex</i>
FHB	Fusarium Head Blight
FRAC	Fungicide Resistance Action Committee
g	Gramm
gDNA	genomische DNA

ggf.	gegebenenfalls
x g	mal Erdbeschleunigung
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _{dest} /H ₂ O _{VE}	einfach destilliertes Wasser
H ₂ O _{Bidest}	zweifach destilliertes Wasser
<i>hph</i>	Hygromycin B Phosphotransferase Gen
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
kb	Kilobasenpaar
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LOD	<i>limit of detection</i>
LOQ	<i>limit of quantification</i>
Lsg.	Lösung
M	molar
Max	maximal
Mbp	Megabasenpaare
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mm	Millimeter
mM	Millimolar
µmol	Mikromol
mol	Mol
ms	Millisekunde(n)
N	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nat	<i>nourseothricin acetyltransferase (nat1)</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
NIV	Nivalenol
nm	Nanometer
NRRL	<i>northern regional research laboratory</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
P1	<i>phenotype 1</i>
Pa	Pascal
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol

pH	lat.: <i>potentia hydrogenii</i> , Wasserstoffionenkonzentration
qRT-PCR	<i>quantitative reverse transcription PCR</i>
RF	<i>resistance factor</i>
RH	<i>relative humidity</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNA-Seq	Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDB	<i>Sabouraud Dextrose Broth</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SSC	Sodiumchlorid/Sodiumcitrat
ssDNA	Einzelstrang-DNA
STC	Sorbitol-Tris-Calciumchlorid
TAE	Tris/Acetat/EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris/EDTA
TM	Schmelztemperatur, Annealingtemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>units</i> (Einheiten)
u. a.	unter anderem
ü. N.	über Nacht
USA	Vereinigte Staaten
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent
w/v	Masseprozent
WT	Wildtyp
x	mal
z. B.	zum Beispiel
ZEA	Zearalenone
z. T.	zum Teil
∅	Durchmesser
%	Prozent

8.6 Curriculum vitae

Wissenschaftlicher Werdegang

- seit 07/2019 Postdoktorand,
Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Nick Talbot,
The Sainsbury Laboratory, UK
- 04/2014 – 06/2019 Doktorstudium,
Arbeitsgruppe Phytopathologie und Pflanzenschutz (Prof. Holger B. Deising),
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland
- 10/2011 – 03/2014 Master of Science in Nutzpflanzenwissenschaften
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland
- Titel der Masterarbeit:
Die Bedeutung von zwei Virulenzfaktoren von *Colletotrichum graminicola* in
der Interaktion mit Mais
- 10/2007 – 12/2010 Bachelor of Science in Agrarwissenschaften
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland
- Titel der Bachelorarbeit:
Deletionsanalysen von drei Genen sekretierter Proteine des Maispathogens
Colletotrichum graminicola

Veröffentlichungen

Ryder LS, Cruz-Mireles N, Molinari C, Eisermann I, Eseola AB, Talbot NJ (2022). The appressorium at a glance. *Journal of Cell Science*, doi: <https://doi.org/10.1242/jcs.259857>

Osés-Ruiz M, Cruz-Mireles N, Martin-Urdiroz M, Soanes DM, Eseola AB, Tang B, Derbyshire P, Nielsen M, Cheema J, Were V, Eisermann I, Kershaw MJ, Yan X, Valdovinos-Ponce G, Molinari C, Littlejohn GR, Valent B, Menke FLH, Talbot NJ. (2021). Appressorium-mediated plant infection by *Magnaporthe oryzae* is regulated by a Pmk1-dependent hierarchical transcriptional network. *Nature Microbiology*, doi: 10.1038/s41564-021-00978-w

Cruz-Mireles N, Eisermann I, Garduño-Rosales M, Molinari C, Ryder LS, Tang B, Yan X, Talbot NJ. (2021). The Biology of Invasive Growth by the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. *Methods in Molecular Biology*, doi: 10.1007/978-1-0716-1613-0_2

He M, Su J, Xu Y, Chen J, Chern M, Lei M, Qi T, Wang Z, Ryder LS, Tang B, Osés-Ruiz M, Zhu K, Cao Y, Yan X, Eisermann I, Luo Y, Li W, Wang J, Yin J, Lam SM, Peng G, Sun X, Zhu X, Ma B, Wang J, Liu J, Qing H, Song L, Wang L, Hou Q, Qin P, Li Y, Fan J, Li D, Wang Y, Wang X, Jiang L, Shui G, Xia Y, Gong G, Huang F, Wang W, Wu X, Li P, Zhu L, Li S, Talbot NJ, Chen X. (2020). Discovery of broad-spectrum fungicides

that block septin-dependent infection processes of pathogenic fungi. *Nature Microbiology*, doi: 10.1038/s41564-020-00790-y

Eisermann I, Motyka V, Kümmel S, Dobrev PI, Hübner K, Deising HB, Wirsal SGR. (2020). CgIPT1 is required for synthesis of cis-zeatin cytokinins and contributes to stress tolerance and virulence in *Colletotrichum graminicola*. *Fungal Genet Biol.*, doi: 10.1016/j.fgb.2020.103436

Eisermann I, Weihmann F, Krijger JJ, Kröling C, Hause G, Menzel M, Pienkny S, Kiesow A, Deising HB, Wirsal SGR. (2019). Two genes in a pathogenicity gene cluster encoding secreted proteins are required for appressorial penetration and infection of the maize anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola*. *Environmental Microbiology*, doi: 10.1111/1462-2920.14819

Weihmann F, Eisermann I, Becher R, Krijger JJ, Hübner K, Deising HB, Wirsal SG. (2016). Correspondence between symptom development of *Colletotrichum graminicola* and fungal biomass, quantified by a newly developed qPCR assay, depends on the maize variety. *BMC Microbiology*, doi: 10.1186/s12866-016-0709-4

Vorträge

- 09/2022 XIII International Fungal Biology Conference (IFBC) in São José dos Campos, Brazil.
- Title: Investigating the turgor-driven, septin dependent infection mechanisms by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*
- 09/2022 Guest lecture at the Universidade de São Paulo, Instituto de Física de São Carlos, Brazil.
- Title: Defining the septin interactome and its role in appressorium-mediated plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*
- 09/2022 Molecular Biology of Fungi 2022 in Kaiserslautern, Germany.
- Title: Defining the septin interactome and its role in appressorium-mediated plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*
Iris Eisermann, Andrew J. Foster, Paul Derbyshire, Frank L.H. Menke, Nicholas J. Talbot
- 06/2022 Guest lecture at the Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Mexico.
- Title: Defining the septin interactome and its role in appressorium-mediated plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*

- 03/2022 31st Fungal Genetics Conference in Asilomar, USA.
- Title: Defining the septin interactome and its role in appressorium-mediated plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*
Iris Eisermann, Andrew J. Foster, Paul Derbyshire, Frank L.H. Menke, Nicholas J. Talbot
- 03/2022 41st Annual Meeting of the German Association for Phytomedicine – digital.
- Title: Defining the septin interactome and its function in appressorium-mediated plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*
Eisermann I., Foster A.J., Derbyshire P., Menke F.L.H., Talbot N.J
- 09/2021 62nd German Plant Protection Conference – digital.
- Title: A single amino acid exchange in a novel transcription factor Azr1 leads to dramatically increased azole resistance in *Fusarium graminearum*
Iris Eisermann, Diana Gottschling, Eric Kemen, Petr Karlovsky, Marielle Vigouroux, Holger B. Deising and Stefan G. R. Wirsal
- Title: Defining the septin interactome and its function in appressorium-mediated plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*
Eisermann I., Foster A.J., Derbyshire P., Menke F.L.H., Talbot N.J.
- 03/2021 40th Annual Meeting of the German Association for Phytomedicine – digital.
- Title: Defining the septin interactome during appressorium-mediated plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*
Iris Eisermann, AJ Foster, P Derbyshire, F Menke, NJ Talbot
- 04/2019 19th International Reinhardsbrunn Symposium, Modern Fungicides and Antifungal Compounds, Germany.
- Title: A single amino acid exchange in the novel transcription factor Azr1 governs azole tolerance of *Fusarium graminearum*
Iris Eisermann, Diana Gottschling, Eric Kemen, Reno Tryono, Ghada Abou Ammar, Holger B. Deising and Stefan G. R. Wirsal
- 11/2018 Guest lecture at the Julius Kühn-Institute Federal Research Centre for Cultivated Plants in Dossenheim, Germany.
- Title: Compromising plant defense - How pathogens escape PAMP-triggered immunity
 Iris Eisermann and Holger B. Deising

- 09/2018 61st German Plant Protection Conference in Hohenheim, Germany.
- Title: A single amino acid exchange in a novel transcription factor leads to dramatically increased azole resistance in *Fusarium graminearum*
Iris Eisermann, Diana Gottschling, Eric Kemen, Reno Tryono, Ghada Abou Ammar, Holger B. Deising and Stefan G. R. Wirsel
- 03/2018 38th Annual Meeting of the German Association for Phytomedicine in Cologne, Germany.
- Title: The secreted cluster proteins Clu5a and Clu5D are required for appressorial penetration and symptom formation of *Colletotrichum graminicola*
Iris Eisermann*, Fabian Weihmann*, Jorrit-Jan Krijger, Gerd Hause, Matthias Menzel, Andreas Kiesow, Holger B. Deising and Stefan G. R. Wirsel
- 06/2017 Plant Science Student Conference (PSSC 2017) in Halle, Germany.
- Title: Two genes in a pathogenicity gene cluster encoding secreted proteins are required for appressorial penetration of the maize anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola*
Iris Eisermann*, Fabian Weihmann*, Jorrit-Jan Krijger, Christian Kröling, Gerd Hause, Matthias Menzel, Holger B. Deising and Stefan G. R. Wirsel
- Poster**
- 12/2022 CELL BIO - An ASCB/EMBO Meeting in Washington, USA.
- Title: Defining the septin interactome and its role in appressorium-mediated plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*
Iris Eisermann, Andrew J. Foster, Paul Derbyshire, Frank L.H. Menke, Nicholas J. Talbot
- 03/2022 31st Fungal Genetics Conference in Asilomar, USA.
- Title: Defining the septin interactome and its role in appressorium-mediated plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*
Iris Eisermann, Andrew J. Foster, Paul Derbyshire, Frank L.H. Menke, Nicholas J. Talbot
- 09/2021 EMBO Workshop, Molecular and cell biology of septins in Berlin, Germany.
- Title: Defining the septin interactome and its role in appressorium-mediated plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*

Iris Eisermann, Andrew J. Foster, Paul Derbyshire, Frank Menke, Nicholas J. Talbot

- 02/2018 14th European Conference on Fungal Genetics (ECFG14) in Haifa, Israel.
- Title: Two genes in a gene cluster encoding secreted proteins are required for appressorial penetration of the maize anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola*
- Iris Eisermann*, Fabian Weihmann*, Jorrit-Jan Krijger, Gerd Hause, Matthias Menzel, Andreas Kiesow, Holger B. Deising and Stefan G. R. Wirsel
- 2016 Joint Research Project "Assessment of wheat cropping systems from an economical, ecological and the society's perspective – the case of plant disease resistance breeding (AWECOS)" funded by the Federal Ministry of Education and Research
- Title: Azole fungicide resistance in agricultural ecosystems: Risk assessment of fungicide application strategies
- Krijger J.-J., Wirsel S. G. R., Serfling A., Eisermann I., Schliebner I., Deising H. B.)

Stipendien und Auszeichnungen

- 2020 Nachwuchspreis 2020
Vergeben durch die Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft e.V.
- 02/2018 Preis für das Beste Poster auf der 14th European Conference on Fungal Genetics in Haifa (Israel) zum Thema: Two genes in a gene cluster encoding secreted proteins are required for appressorial penetration of the maize anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola*
- 04/2014 – 06/2015 Stipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz des Landes Sachsen-Anhalt
- 11/2013 Beste Absolventin des Abschlussjahrganges 2013 im Masterstudiengang Nutzpflanzenwissenschaften
- Vergeben durch die Gesellschaft zur Förderung der Agrar- und Ernährungswissenschaften an der Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg e.V.

Datum

Unterschrift der Antragstellerin

8.7 Danksagung

Ein besonderes Dankeschön geht an Herrn Prof. Dr. H. B. Deising für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe Phytopathologie und Pflanzenschutz zu promovieren, für die Unterstützung bei der Anfertigung meiner Dissertation und darüber hinaus für seine wertvollen Ratschläge.

Nicht weniger möchte ich mich bei Herrn Dr. Stefan G. R. Wirsal für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Betreuung und die Durchsicht dieser Dissertation bedanken. Er hat mit zahlreichen Anregungen und produktiven Gesprächen sowie kritischen Betrachtungen und differenzierten Anmerkungen in hohem Masse zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Andreas von Tiedemann für die Bereitschaft zur Begutachtung meiner Dissertation.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. P. Karlovsky und Frau Luciana Macis für die HPLC/MS Analysen, welche diesem Projekt wertvolle Erkenntnisse gebracht haben.

Ein besonderes Dankeschön geht an Diana Gottschling für ihre fantastische fachliche und moralische Unterstützung.

Des Weiteren möchte ich mich bei Iris Hunold, Andrea Beutel und Doris Jany für ihre ausgezeichnete technische Unterstützung bedanken. Ebenso danke ich Elke Vollmer für die professionelle Anzucht und Pflege der Pflanzen sowie für die Unterstützung bei Großexperimenten. Auch möchte ich Sandra Suske für ihre wertvollen Tipps und Anregungen danken.

Darüber hinaus danke ich auch allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Phytopathologie und Pflanzenschutz für ihre Unterstützung und Freundlichkeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern Monika und Kurt sowie bei meinem Bruder Florian, meiner Schwägerin Sonja und meiner kleinen Nichte Anna bedanken, die mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglichten und die ich liebe. Tief verbunden und dankbar bin ich Marisela, Iris und Andree die mir ebenso Familie sind und denen ich für ihre unglaubliche Unterstützung und ihren liebevollen Beistand dankbar bin. Meinen Freunden Bettina, Caro, Christina, Daria, Diana, Jana, Julia, Kelly, Lea und Nadine danke ich für ihre uneingeschränkte Unterstützung und ihre Herzlichkeit.

Abschließend gilt mein Dank der finanziellen Förderung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und die Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt.

8.8 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Datum

Unterschrift der Antragstellerin