

Interaktionen zwischen saprophagen Insekten und Schimmelpilzen - Eine evolutionsökologische Analyse



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von **Monika Trienens**

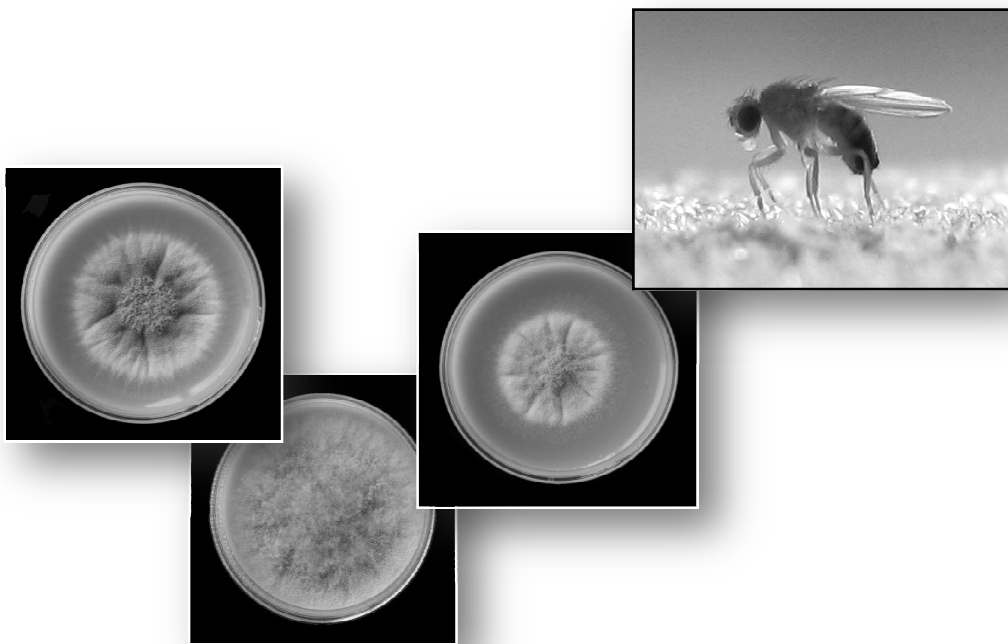
Kiel 2010

Referent: Prof. Dr. Hinrich Schulenburg
Koreferent: Prof. Dr. Thomas Roeder

Tag der mündlichen Prüfung: 09.04.2010
Zum Druck genehmigt: 09.04.2010

gez. Prof. Dr. Lutz Kipp, Dekan

Interaktionen zwischen saprophagen Insekten und Schimmelpilzen - Eine evolutionsökologische Analyse



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von **Monika Trienens**

Kiel 2010

Diese Arbeit wurde vom Mai 2007 bis April 2009 finanziell von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) unterstützt.

Weitere finanzielle Unterstützung erhielt ich für vier Monate von der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel über Werksverträge.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht, zur Veröffentlichung eingereicht bzw. auf Tagungen präsentiert:

Publikationen:

WÖLFLE S., TRIENENS M., ROHLFS M., 2009 Experimental evolution of resistance against a competing fungus in *Drosophila*. *Oecologia*, Springer, **161**(4): 781-790 (Kapitel 7)

TRIESENS M, KELLER NP, ROHLFS M Fruit, flies and filamentous fungi – experimental analysis of animal-microbe competition using *Drosophila melanogaster* and *Aspergillus* as a model system (akzeptiert *Oikos* 10.1111/j.1600-0706.2010.18088.x) (Kapitel 6)

TRIESENS M, ROHLFS M Experimental evolution of defence against a competitive mould confers protection from fungal toxin in *Drosophila melanogaster* (eingereicht) (Kapitel 7)

ROHLFS M., TRIENENS M., FOHGRUB U. & KEMPKEN F., 2009 Evolutionary and ecological interactions of mould and insects. In: ANKE T (ed) *The Mycota XV. Physiology and Genetics: Selected Basic and Applied Aspects*. Springer Verlag, Heidelberg, New York, Tokyo

Tagungsbeiträge:

Poster

TRIESENS, M. & ROHLFS, M., 2007 Functional genomics of interkingdom competition between insects and fungi – Jahrestagung der DZG, Köln (D)

TRIESENS, M., WÖLFLE, S. & ROHLFS, M., 2008 Correlated responses to selection for increased resistance against a fungal competitor in *Drosophila melanogaster* –Jahrestagung der DZG (Jena) – **1st poster award**

TRIESENS, M. FOHGRUB, U., KEMPKEN F. & ROHLFS, M., 2009 Ecological functional genomics of insect-fungus competition – Jahrestagung der DGaaE (Göttingen)

Vorträge

TRIESENS, M. & ROHLFS, M., 2008 The role of fungal chemical diversity in an antagonistic insect-mould interactions – Jahrestagung der GfÖ (Leipzig)

TRIESENS, M. & ROHLFS, M., 2009 Insect-mould interaction: The effect of fungal secondary metabolites – Jahrestagung der DGaaE (Göttingen)

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung/Abstract	1
2. Einleitung – Allgemeiner Teil	3
3. Sekundärmetabolite – Signale und Verteidigung von Pilzen und Pflanzen	11
4. Biologie der Modellorganismen und generelle Methodik	15
4.1. <i>Drosophila melanogaster</i>	15
4.2. <i>Aspergillus</i> ssp.	18
4.3. Aufrechterhaltung von <i>Drosophila</i> -Populationen und <i>Aspergillus</i> -Kolonien.....	21
4.3.1. Zucht der <i>Drosophila melanogaster</i> Populationen	21
4.3.2. Zucht der <i>Aspergillus</i> Linien – Gewinnung von Konidien.....	23
4.4. Generelle Bedingungen und Ausführung der Experimente	23
4.4.1. Sterilisation der Eier	23
4.4.2. Experimentelle Einheiten	24
5. <i>Drosophila melanogaster</i> in Konfrontation mit <i>Aspergillus</i> Wildtyp	25
5.1. Konfrontation mit <i>Aspergillus</i> WT – Material und Methoden	25
5.2. Konfrontation mit <i>Aspergillus</i> WT – Ergebnisse.....	27
5.3. <i>D. melanogaster</i> in Konfrontation mit <i>Aspergillus</i> WT – Diskussion	32
6. Sekundärmetabolit-defiziente Schimmelpilzmutanten ($\Delta laeA$)	35
6.1. Beeinflussung der <i>Drosophila</i> -Fitness durch die Defizitmutanten $\Delta laeA$	35
6.1.1. Sekundärmetabolit-Defizitmutante $\Delta laeA$ – Material und Methoden	36
6.1.2. Sekundärmetabolit-Defizitmutante $\Delta laeA$ – Ergebnisse.....	39
6.2. Auswirkungen der Sekundärmetabolit-Defizienz auf die Pilzfitness.....	45
6.2.1. Fitness Sekundärmetabolit-defizienter Schimmelpilze – Material und Methoden	46
6.2.2. Fitness Sekundärmetabolit-defizienter Schimmelpilze – Ergebnisse.....	47
6.3. Beeinflussung des Sekundärmetabolismus durch weitere Faktoren.....	52
6.3.1. Weitere Sekundärmetabolit-defiziente Pilzmutanten – Material und Methoden	54
6.3.2. Weitere Sekundärmetabolit-defiziente Pilzmutanten – Ergebnisse.....	56
6.4. Sekundärmetabolit-Defizitmutanten: <i>LaeA</i> , <i>Velvet</i> und <i>Oxylipine</i> – Diskussion	58
7. Experimentelle Evolution – Selektion in <i>Drosophila</i> Populationen	63
7.1. Das Selektionsexperiment.....	64
7.2. Widerstandsfähigkeit gegenüber <i>A. nidulans</i> WT als direkte Antwort.....	67
7.2.1. Konfrontation mit <i>A. nidulans</i> WT– Material und Methoden.....	67
7.2.2. Konfrontation mit <i>A. nidulans</i> WT – Ergebnisse	68
7.3. Toxinresistenz als korrelierte Antwort.....	72
7.3.1. Toxinresistenz in selektierten Populationen – Material und Methoden	72
7.3.2. Toxinresistenz in selektierten <i>Drosophila</i> Populationen – Ergebnisse	73
7.4. Widerstandsfähigkeit gegenüber weiteren <i>Aspergilli</i> als korrelierte Antwort	76
7.4.1. Konfrontation mit weiteren <i>Aspergilli</i> – Material und Methode	76
7.4.2. Konfrontation mit weiteren <i>Aspergilli</i> – Ergebnisse	77

7.5.	Parasitoidenresistenz als korrelierte Antwort.....	78
7.5.1.	Parasitoidenresistenz selektierter <i>Drosophila</i> Populationen – Material und Methode	78
7.5.2.	Parasitoidenresistenz selektierter <i>Drosophila</i> Populationen – Ergebnisse.....	79
7.6.	Beeinflussung des Pilzwachstums durch selektierte <i>Drosophila</i> Populationen.....	79
7.6.1.	Beeinflussung des Pilzwachstums – Material und Methode.....	79
7.6.2.	Beeinflussung des Pilzwachstums – Ergebnisse	80
7.7.	Experimentelle Evolution – Diskussion.....	81
8.	Abschließende Diskussion und Perspektiven	85
9.	Literatur	93
Anhang	101	
A.1	Pilz Linien.....	101
A.2	Material und Methoden zur Genexpression in <i>Drosophila</i>	102
A.2.1	Konfrontation der <i>D. melanogaster</i> Larven mit <i>A. nidulans</i> WT.....	102
A.2.2	RNA-Isolation nach „Phenol-Chloroform-Extraktion“	102
A.2.3	cDNA-Synthese und Amplifikation der cDNA.....	103
A.2.4	aa-cRNA-Synthese, Aufreinigung und Anfärbung (<i>labelling</i>)	104
A.2.5	Hybridisierung der Microarrays	105
A.3	Abkürzungsverzeichnis.....	107
A.4	Danksagung.....	108
A.5	Lebenslauf	109
A.6	Erklärung	110

1. Zusammenfassung/Abstract

Larven der Taufliege *Drosophila melanogaster* und Schimmelpilze können sich in einer Konkurrenzsituation um die räumlich und zeitlich limitierte Ressource verrottenden organischen Materials gegenüber stehen. Konkurrenz kann, wenn sie einen ausreichend starken Selektionsdruck auf die Antagonisten ausübt, zu evolutiven Veränderungen von Eigenschaften der beiden Interaktionspartner führen. Diese Veränderungen können dann aufgrund einer Folge von Anpassung und Gegenanpassung in ein koevolutionäres Wettrüsten münden.

Schimmelpilze sind in der Lage z.T. hochgiftige Mykotoxine zu synthetisieren und in das von ihnen bewachsene Substrat zu sekretieren. Hierdurch kann das Substrat, das neben den Schimmelpilzen auch von anderen Organismen als Nahrungsquelle genutzt wird, unattraktiv oder unverwertbar für weitere Konsumenten werden. Demzufolge ließe sich von einer aktiven Verteidigung dieser Ressource durch den Schimmelpilz über die Mykotoxine sprechen. Während sich beim Menschen im Laufe der Evolution eine Abneigung gegen mit Schimmelpilz bewachsene Lebensmittel und so ein Vermeidungsverhalten entwickelt hat, zeigen weibliche Fliegen von *D. melanogaster* bezüglich der Substratwahl während der Eiablage kein solches Vermeidungsverhalten. Da dennoch eine Entwicklung der Larven zur adulten Fliege in Anwesenheit von Schimmelpilzen, wenn auch eingeschränkt, zu beobachten ist, kann davon ausgegangen werden, dass in den Larven Mechanismen begünstigt wurden, diese ansonsten lebensfeindliche Situation zu überleben.

In unterschiedlichen Konfrontationsexperimenten von *D. melanogaster* und Mykotoxinproduzierenden Schimmelpilzen der Gattung *Aspergillus* konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit oder Abwesenheit von Sekundärmetaboliten respektive Mykotoxinen einen großen Einfluss auf die Entwicklungsfähigkeit der Larven von *D. melanogaster* ausüben und somit eine Schlüsselrolle in der Interaktion zwischen saprophagen Insekten und Schimmelpilzen innehaben. Die Konfrontation mit Schimmelpilzmutanten, die aufgrund einer gentechnischen Manipulation nicht mehr in der Lage waren, ihre gesamten Mykotoxine zu produzieren, verursachte eine geringere Mortalität unter den Fliegenlarven als die Konfrontation mit dem Wildtyp derselben Pilzart. Gleichzeitig reduzierte die Anwesenheit der Fliegenlarven das Wachstum der Wildtyplinien weniger stark als das der chemisch defizienten Schimmelpilzlinien.

Weitere Evidenz für die Schlüsselrolle der Mykotoxine in der Insekten-Schimmelpilz Interaktion ergab sich aus einer erhöhten Toleranz gegenüber *A. nidulans* in selektierten *Drosophila* Populationen, die mit einer gesteigerten Resistenz gegenüber einem von diesem Schimmelpilz synthetisierten Mykotoxin einherging. Hier ist eher von einer Toleranz als von einer Resistenz auszugehen, da die selektierten Larven trotz eines gesteigerten Überlebens keinen stärker negativen Einfluss auf das Wachstum von *A. nidulans* ausübten, als die nicht selektierten Populationen.

Warum sind Schimmelpilze giftig? Überraschenderweise wurden bisher nur selten experimentelle Nachweismethoden angewandt, den adaptiven Wert der Toxinsynthese von Schimmelpilzen zu ermitteln. Die Kombination von *Aspergillus* spp. und *Drosophila melanogaster* erwies sich als ein geeignetes Modellsystem zur evolutionsökologischen Analyse dieser Fragestellung und bietet weiterhin vielversprechende Anwendungen für künftige Untersuchungen.

Abstract

Larvae of the fruit fly *Drosophila melanogaster* and moulds may face situations where they have to compete with each other for resources of rotting organic material limited in space and time. If competition exerts a sufficiently strong selection pressure on the antagonists, it can lead to evolutionary changes in the properties of the two interacting partners. These changes can then lead to a co-evolutionary arms race due to a consecution of adaptations and counter-adaptations.

Moulds are able to synthesize mycotoxins that may in part be highly toxic, and they are able to secrete them into the substrate they grow on. Through this the substrate that would usually also be used as a food source by other organisms, can be made unattractive and unusable. Hence, one may consider moulds to actively defend their resource via the mycotoxins they produce. While aversion against mouldy food and therefore avoidance behaviour have developed in humans in the course of evolution, female flies of *D. melanogaster* do not show such an avoidance behaviour in the choice of their oviposition substrate. Since a development of larvae to adult flies can still be observed when moulds are present - even though to a limited degree - one may assume that mechanisms enabling larvae to survive this otherwise hostile situation were favoured.

In various confrontation experiments of *D. melanogaster* and mycotoxin synthesising moulds of the genus *Aspergillus* it could be shown that the presence or absence of mycotoxins strongly influence the developmental ability of *D. melanogaster* larvae and therefore hold a key role in the interaction of saprophagous insects and moulds. The confrontation with genetically manipulated fungal strains that lack the ability to produce their entire arsenal of mycotoxins caused a lower mortality among fly larvae than the confrontation with the wild type strains of the same fungal species. Coinstantaneously the presence of fly larvae reduced the growth of wild type fungal strains to a lesser extent than that of chemically deficient fungal strains.

Further evidence for the key role of mycotoxins in the insect-fungus interaction arose from an increased tolerance of selected populations of *Drosophila* against *A. nidulans*, and this tolerance was accompanied by an increased resistance to a mycotoxin synthesized by this fungus. Tolerance rather than resistance is to be assumed here, since selected larvae, despite exhibiting an increased survival, did not suppress fungal growth to a higher degree than non-selected larvae.

Why are moulds toxic? Surprisingly, experimental methods have only rarely been applied in order to investigate the adaptive value of toxin-synthesis in moulds. The combination of *Aspergillus* ssp. and *Drosophila melanogaster* has proven to be a convenient model system for the evolutionary ecological analysis of this question. Moreover it continues to be a promising system for future investigations.

2. Einleitung – Allgemeiner Teil

Um energiereiche in ihrer Verfügbarkeit jedoch begrenzte Ressourcen gibt es zwischen Organismen einen starken Konkurrenzkampf, wie zahlreichen Beispielen aus der Primärliteratur und Lehrbüchern zu entnehmen ist (BEGON et al. 1998, SMITH & SMITH 2009, STOKES et al. 2009, ABRAMS 2010, AMMUNÉT et al. 2010). Diese Konkurrenz kann zwischen Individuen der gleichen Art, nah verwandten Arten aber auch zwischen Arten verschiedener Reiche stattfinden. Letzteres, die Konkurrenz zwischen phylogenetisch weit divergierenden Arten, *interkingdom competition*, ist nach wiederholter Ansicht potenziell weit verbreitet jedoch bislang wenig untersucht (JANZEN 1977, HOCHBERG & LAWTON 1990, ROHLFS et al. 2005, BURKEPILE et al. 2006). Hierbei spielen Mikroorganismen eine weitaus größere Rolle als die ihnen oft begrenzt zugedachte Rolle der Destruenten.

Saprotrophe Mikroorganismen können sich nicht oder nur in sehr begrenztem Maße selbständig fortbewegen und damit geeignete Habitate (totes organisches Material) besiedeln. Haben sie eine Nahrungsquelle erreicht, sind sie nicht in der Lage, diese vor anderen Organismen zu verbergen, z.B. in dem sie sie an einen schlecht einsehbaren Ort bringen oder vergraben. Als oftmals mikroskopisch kleine Organismen ist darüber hinaus ihre Nahrungsquelle zugleich ihr Lebensraum. Der Verzehr der Ressource durch größere Organismen bedeutet für sie nicht nur den Verlust der Nahrungsquelle, sondern zugleich ihren Tod, da sie von großen Saprophyten mit der Nahrung aufgenommen werden. Eine effiziente Strategie zur Verteidigung ihrer Ressource ist somit in doppelter Hinsicht überlebensnotwendig.

Eine große Anzahl im Boden lebender Mikroorganismen können antibiotisch wirkende Stoffe produzieren (VINING 1990). Hierbei zeigt sich, dass von Mikroorganismen, die generell lebensfeindliche und dadurch konkurrenzärmere Habitate besiedeln, weniger bis keine dieser antibiotisch wirkenden Substanzen isoliert werden können. In Böden mit einer großen Vielfalt an interagierenden Organismen hingegen hat die Anwesenheit von Antagonisten vermutlich zur Evolution von Mechanismen geführt, die es erlauben sich gegen natürliche Gegenspieler zu verteidigen und durchzusetzen.

Mikroorganismen nutzen oft Sekundärmetabolite zur Verteidigung ihrer Ressourcen gegenüber anderen Mikroorganismen (VINING 1990). Pilzkolonien, die auf Nährböden in einer Petrischale wachsen, verursachen mitunter deutliche Hemmhöfe innerhalb derer es Bakterien nicht gelingt zu wachsen. Die Hemmhöfe zeigen, dass sich antimikrobiell wirkende Stoffe nicht nur in den produzierenden Organismen befinden, sondern von ihnen auch in ihre unmittelbare Umgebung in das Substrat sekretiert werden. Diese chemische Verteidigung (*Allelopathie*) ermöglicht es Mikroorganismen jedoch nicht nur mit anderen Mikroorganismen zu konkurrieren, sondern auch größere Antagonisten von Ressourcen fernzuhalten (BURKEPILE et al. 2006). Konsumiert z.B. ein Aasfresser einen Kadaver in dem zuvor durch Mikroorganismen produzierte Stoffe vorhanden sind, die zu Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe, toxischen Reaktionen oder anderen die Fitness beeinträchtigenden Symptomen führen, wird dieser sie in Zukunft meiden. Voraussetzung dafür ist, dass ein Lerneffekt in Form einer Verhaltensänderung etabliert werden konnte und sich die mikrobielle Veränderung des Aases, z.B. durch volatile Stoffe, detektieren lässt. Diese Art der chemisch vermittelten Interaktion zwischen Mikroorganismen und verschiedenen Tiergruppen ist bislang wenig untersucht, jedoch ist zu vermuten, dass sie weit verbreitet ist (JANZEN 1977, BURKEPILE et al. 2006).

Um ihre Fitness (Reproduktionserfolg pro Lebenszeit) zu steigern, sollten Mikroorganismen Strategien entwickeln, ihre Ressourcen für sich zu sichern und sich selbst davor zu schützen, ge-

fressen zu werden. Gleichzeitig sollten andere Organismen, die die gleiche Ressource nutzen, Gegenstrategien entwickeln, entweder auf der Ebene der Vermeidung (Verhalten) oder auf metabolischer Ebene (z.B. Detoxifizierung) (JANZEN 1977, ROZEN et al. 2008). Totengräberkäfer der Gattung *Nicrophorus* z.B. schützen die Nahrung ihrer Nachkommen (Aas) durch Reinigung der Kadaver und Applizierung von antibiotischem Oral- und Analsekret und verhindern so das Wachstum von Pilzen und Bakterien, welche einen negativen Effekt auf die Anzahl und Körpergröße der Nachkommen ausüben (ROZEN et al. 2008). Die Käfer haben durch die Entwicklung der Brutpflege eine Gegenstrategie gegenüber der mikrobiellen Flora etabliert. Darüber hinaus bevorzugen die Weibchen des Totengräberkäfers frisches Aas gegenüber älterem, zeigen somit zusätzlich eine Vermeidungsstrategie.

Im Laufe der Evolution haben sich beim Menschen Schutzmechanismen herausgebildet, mit Schimmelpilz kontaminierte Nahrung zu meiden. Bei vielen reicht der Anblick eines Schimmelpilzes aus, um Ekel hervorzurufen. Spätestens der modrige, erdige Geschmack wird die meisten davon abhalten, verschimmeltes Brot, Obst etc. weiter zu verzehren. Dieses Verhalten erfüllt eine wichtige schützende Funktion, da einige Schimmelpilzarten in der Lage sind hochgradig toxische Substanzen zu synthetisieren, die stark gesundheitsschädigende Folgen, bis hin zum Tod, auf den menschlichen Organismus ausüben können.

Sekundärmetabolite von Schimmelpilzen

Die Übergänge zwischen Primär und Sekundärmetabolismus sind fließend, da zur Synthese von Sekundärmetaboliten häufig Substanzen des Primärmetabolismus als Ausgangsstoffe verwendet und übergreifende enzymatische Prozesse genutzt werden. Vereinfacht lässt sich jedoch sagen, dass Sekundärmetabolite nicht zwingend für das Wachstum eines Organismus benötigt werden. Ein weiteres Charakteristikum ist, dass einzelne Sekundärmetabolite nur innerhalb einer beschränkten taxonomischen Gruppe vorkommen (BENNETT & BENTLEY 1989, VINING 1990). Nahverwandte Arten können sich daher in der Zusammensetzung ihrer Sekundärmetabolite deutlich unterscheiden. Primärmetabolite sind hingegen i.d.R. weit verbreitete Stoffwechselprodukte.

Schimmelpilze stellen keine phylogenetisch einheitliche Gruppe dar. Vielmehr liegt diesem Begriff eine Beschreibung des Habitus zugrunde. Schimmelpilze wachsen filamentös, d. h. sie bilden fadenförmige Ausläufer (Hyphen) aus, die mehr oder weniger radiär symmetrisch von einem Ursprung (Inokulationspunkt) ausgehend wachsen.

Die Sekundärmetabolite von Schimmelpilzen sind strukturell sehr divers: Polyketide, Peptide, Alkaloide und Terpene zählen zu den Hauptgruppen pilzlicher Sekundärmetabolite, lassen sich jedoch auf wenige Synthesewege zurückführen (KELLER et al. 2005). Das Wirkungsspektrum reicht von Wachstumshemmung bei Bakterien, Pilzen, Viren und menschlichen Tumorzellen, bis zu Wirkungen als Zellgifte, Mutagene, Karzinogene, Immunsuppressiva und Enzymhemmer (KELLER et al. 2005). Sekundärmetabolite können somit für den Menschen von großem Nutzen sein, aber auch fatale Folgen haben (WANG & GROOPMAN 1999).

Eine Gruppe von Metaboliten der Schimmelpilze, die Oxylipine, weisen strukturelle Ähnlichkeiten mit denen der Pflanzen auf. Oxylipine dienen in Pflanzen der Signalübertragung, ebenso wie in Pilzen (BUROW et al. 1997, CALVO et al. 1999). Unter anderem haben sie in Pilzen einen Einfluss auf die Sekundärmetaboliten-Produktion. In wieweit sie hier der Regulation von Verteidigungsmechanismen dienen, wie sie es in zahlreichen Herbivoren-Pflanzen-Interaktionen tun, ist unklar. Die strukturelle und evtl. funktionelle Übereinstimmung der Oxylipine von Schimmelpilzen und Pflanzen macht eine Betrachtung von existierenden Mechanismen in letzteren interessant (siehe hierzu auch Kapitel 3).

Mykotoxine

Im Jahre 1960 starben in England aus zunächst ungeklärten Gründen auf verschiedenen Farmen zahlreiche Truthühner. Die plötzlich auftretende Erscheinung wurde als *turkey X disease* bezeichnet. Als eine Übereinstimmung zwischen den Zuchtbetrieben stellte sich die Verfütterung von Erdnussmehl heraus, welches aus Brasilien importiert wurde. Obduktionen zeigten, dass die Todesursache eine akute hepatische Nekrose (Absterben von Leberzellen) war. Ähnliche Befunde werden durch pflanzliche Alkaloide hervorgerufen, wie sie z.B. von *Senecio* Arten (Greiskraut) produziert werden. Bekannte Toxine, Insektizide oder Alkaloide konnten jedoch nicht aus dem Futtermittel isoliert werden (LANCASTER et al. 1961). Ein erster Hinweis auf Pilzmetabolite wurde gefunden, als in Kenia Todesfälle bei Entenküken auftraten, die mit hochgradig von Schimmelpilzen befallenen Nüssen aus Uganda gefüttert worden waren.

Bei der papierchromatographischen Charakterisierung der unbekannt, aus Beständen des in England verfütterten Erdnussmehls isolierten Substanz, zeigte diese eine blau leuchtende Fluoreszenz. Eine solch fluoreszierende Substanz wurde ebenfalls in Pilzkulturen der aus Uganda stammenden Nüsse gefunden. Die Extrakte aus den Uganda-Nüssen führten bei Verfütterung zu den gleichen Symptomen, welche das aus Brasilien stammende Erdnussmehl in England hervorgerufen hatte. Unbefallene, jedoch mit Pilzen aus Uganda inokulierte Nüsse, führten in einem anschließenden Fütterungsexperiment ebenfalls zu den bekannten Symptomen wie z.B. Leberzirrhose. Auch hier leuchtete das Extrakt in der Papierchromatographie blau (SARGEANT et al. 1961). Der Schimmelpilz und Produzent der unbekannt fluoreszierenden Substanz wurde als *Aspergillus flavus* Link ex Fries identifiziert. Heute ist bekannt, dass es sich bei der blau fluoreszierenden Substanz um das Mykotoxin *Aflatoxin* handelte.

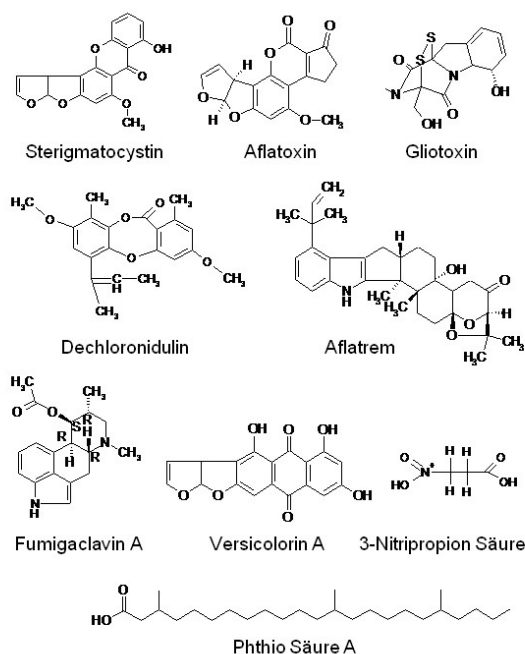


Abb. 2-1 Strukturformeln von Mykotoxinen

Die Auswahl zeigt Mykotoxine die von *A. nidulans*, *A. fumigatus* bzw. *A. flavus* synthetisiert werden (Quelle der Strukturformeln: <http://www.aspergillus.org.uk>)

von, von vielen ist die Identität und Wirkungsweise allerdings nach wie vor nicht bekannt.

Die Produktion von Mykotoxinen ist abhängig von den Wachstumsbedingungen des produzierenden Pilzes (CALVO et al. 2002). Die Art der Kohlenstoffquelle, Stickstoff- und Sauerstoffverfügbarkeit, pH-Wert, Feuchte und Temperatur haben einen Einfluss auf die Quantität der syn-

Unter dem Begriff *Mykotoxin* werden Substanzen zusammengefasst, welche von Schimmelpilzen synthetisiert werden und bereits in geringen Konzentrationen eine toxische Wirkung auf den Menschen oder andere Tiergruppen ausüben (im Gegensatz dazu werden *Pilzgifte* von Großpilzen/Hutpilzen synthetisiert). Stoffe mit toxischer Wirkung auf Pflanzen werden als Phytotoxine bezeichnet (eine Verwechslung mit von Pflanzen synthetisierten Toxinen ist möglich) und so von der weiteren Gruppe der antibakteriell wirkenden Substanzen unterschieden. Bei dieser Unterscheidung handelt es sich somit um eine reine Klassifizierung nach Wirkungsspektren aus anthroporelationaler Sichtweise (BENNETT & KLICH 2003).

Mykotoxine sind strukturell divers (STEYN 1995, BENNETT & KLICH 2003). Häufig finden sich Kohlenstoffgerüste mit gesättigten und ungesättigten C5- und C6-Ringen die in verschiedenster Weise substituiert sind (vgl. Abb. 2-1). Inzwischen sind zahlreiche Mykotoxine charakterisiert

thetisierten Mykotoxine (MATELES & ADYE 1965, DAVIS et al. 1966, DIENER et al. 1987, CALVO et al. 2002, KAMEI & WATANABE 2005, DELGADO-VIRGEN & GUZMAN-DE-PEÑA 2009).

Die Anzahl der von einer Schimmelpilzart synthetisierten Mykotoxine kann stark variieren. Für die in dieser Arbeit verwendeten *Aspergillus* Arten sind bislang für *A. nidulans* 1 Mykotoxin (Sterigmatocystin), für *A. fumigatus* 15 (u.a. Gliotoxin) und für *A. flavus* 14 (u.a. Aflatoxin) Mykotoxine bekannt (<http://www.aspergillus.org.uk>; Stand Jan. 2010).

Aflatoxin ist der Naturstoff mit der höchsten bekannten Karzinogenität. In hohen Konzentrationen ist Aflatoxin akut toxisch, z.B. in der Leber und der Niere, und hat immunsupprimierende Auswirkungen auf tierische Organismen (ROBBANA-BARNAT et al. 1989, EATON & GALLAGHER 1994, KAMEI & WATANABE 2005). In geringeren Konzentrationen wirkt Aflatoxin bei chronischer Exposition karzinogen und mutagen. Aflatoxin ist in einigen Teilen der Welt durch die starke Verbreitung von *A. flavus* als Kontaminant von Nahrungsmitteln der Hauptfaktor für Leberkrebs (JOHNSON & GUENGERICH 1997).

Viele Mykotoxine können die Reaktionen des Immunsystems verändern und so evtl. durch Ausschalten einiger Funktionen des Immunsystems dazu beitragen, dass pathogene Pilze ungestört durch Gegenmaßnahmen ihrer Wirtsorganismen in diesen wachsen können. Aflatoxin z.B. unterdrückt die Funktion von Makrophagen (LIOI et al. 2004). Ebenso können Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten betroffen sein (MÜLLER et al. 2004). Gliotoxin, das weniger häufig in Nahrungsmitteln zu finden ist, wirkt immunsupprimierend. Eine mögliche Funktion als Virulenzfaktor für *Aspergillus fumigatus* wird diskutiert (BOK et al. 2005, SPIKES et al. 2008). In dieser Funktion könnte Gliotoxin dazu beitragen, die Immunreaktion eines Organismus zu schwächen, und so die Fitness des Schimmelpilzes während der Ausbildung einer Mykose vorteilhaft zu beeinflussen.

Die funktionelle Bedeutung von Mykotoxinen für den produzierenden Organismus ist bislang weitgehend ungeklärt. In mehreren wissenschaftlichen Studien werden Mykotoxine als chemische Verteidigung gegen Prädatoren und Konkurrenten diskutiert (WICKLOW & COLE 1982, ROHLFS et al. 2005, ROHLFS et al. 2007).

Die Synthese von Sekundärmetaboliten kann z.T. zahlreiche Schritte benötigen (YU et al. 2004). Die Etablierung einer solch komplexen und präzise regulierten Maschinerie (BOK et al. 2005, KELLER et al. 2006, BAYRAM et al. 2008, BOK et al. 2009) impliziert eine dahinterstehende positive Selektion (VINING 1990), eine adaptive Bedeutung für den Organismus, bei welchem sich diese Maschinerie entwickelt hat. Würde kein adaptiver Wert von den Sekundärmetaboliten ausgeübt werden, so sollte im Verlauf der Evolution ein Verlust der Funktionalität durch Mutation auftreten. Diese Überlegungen legen nahe, dass Sekundärmetabolite ihren Organismen einen Fitnessvorteil gewähren. Die ebenso diskutierte Funktion von Sekundärmetaboliten als „Abfallstoffe“ bzw. Einlagerung von z.B. Stickstoff als Reservoir, konnte durch keine Studie belegt werden und wird daher weitestgehend nicht mehr berücksichtigt (VINING 1990).

Interaktion zwischen Schimmelpilzen und saprophagen Insekten

Filamentöse Pilze sind als saprotrophe Organismen ebenso wie saprophage Insekten auf kurzlebige und lokal limitierte Ressourcen toter verrottender organischer Materie angewiesen. Aufgrund des unvorhersehbaren Auftretens und der zeitlich begrenzten Verfügbarkeit, sind Eigenschaften wie ein schnelles Wachstum nach der Okkupation und eine schnelle Reproduktion vorteilhaft für saprophage Organismen, um in der Konkurrenz mit anderen Organismen um die stark limitierte Ressource zu obsiegen.

Die Drosophiliden stellen eine große Familie von saprophagen Insekten dar, die, wie zahlreiche andere Insekten, sich vor allem von verrottendem organischem Material ernähren. Aufgrund ihrer Lebensweise kommen sie dabei mit verschiedensten Mikroorganismen in Kontakt. Einzelne Gruppen innerhalb dieser Familie sind häufig auf bestimmte Nahrungsquellen spezialisiert. *Drosophila melanogaster* nutzt hierbei bevorzugt verrottende Früchte als Substrat für ihre Larven, wobei sie sich überwiegend von den auf den Früchten wachsenden Hefen ernähren, die essentiell für die Entwicklung der Larven sind (BEGON 1982). Das Substrat der Larven ist zugleich häufig (bis zu 95%) von filamentösen Pilzen bewachsen (ROHLFS & OBMANN 2009), die einen negativen Einfluss auf die Fitness der Insektenlarven ausüben (ROHLFS et al. 2005). Mit Mikroorganismen die *D. melanogaster* nicht als Nahrungsressource nutzt, kann sie in Konkurrenz um die limitierte Ressource stehen.

Zu beobachten ist, dass *Drosophila* Weibchen ihre Eier aggregiert ablegen (ROHLFS & HOFFMEISTER 2004). Dieses Verhalten kann eine strategische Anpassung an die Konkurrenz mit Schimmelpilzen sein (WERTHEIM et al. 2002, ROHLFS & HOFFMEISTER 2003, ROHLFS 2005b, WERTHEIM 2005), bei der zugleich der negative Effekt einer erhöhten intraspezifischen Konkurrenz toleriert wird (Allee-Effekt). *Drosophila*-Larven unterdrücken durch ihr Fraßverhalten am und in der Nähe des Pilzes, sowie durch ihre Bewegungen und Umwälzungen des Substrates, aktiv das Wachstum der Pilze. Je größer die Anzahl der Larven hierbei ist, desto stärker ist der negative Einfluss auf das Pilzwachstum (ROHLFS et al. 2005). Das verringerte Pilzwachstum wiederum reduziert möglicherweise die Kontamination des Substrates mit Mykotoxinen, die insektizide Wirkungen haben können (VINING 1990).



Abb. 2-2 Mit Schimmelpilz bewachsener Apfel

In natürlichen *Drosophila*-Populationen können unterschiedliche Grade an Konkurrenzfähigkeit gegenüber filamentösen Pilzen gefunden werden (ROHLFS 2006), die auf intraspezifischer genetischer Variation beruht. Grund für diese Variabilität in der Konkurrenzfähigkeit kann die Unvorhersehbarkeit der Konfrontation mit verschiedenen Schimmelpilzen sein. Auf welchen Substrateinheiten welche Schimmelpilzart auftritt und ob und welche Toxine vorhanden sind, kann räumlich und zeitlich stark variieren. Aus diesem Grund bleibt die genetische Variabilität innerhalb der Subpopulation erhalten (ZENG et al. 2006). Zumal die Resistenz gegen Schimmelpilze kostenintensiv sein kann und weniger resistente Individuen in Abwesenheit von Schimmel-

pilzen einen Fitnessvorteil haben können (WÖLFLE et al. 2009). Diese genetisch bedingte Vielfalt kann somit zu lokalen Anpassungsereignissen in Insektenpopulationen führen, die aufgrund von Veränderungen in der Schimmelpilzflora des Entwicklungssubstrates vermittelt werden.

Drosophila melanogaster ist als Nahrungsgeneralist in unterschiedlichen Habitaten mit verschiedenen mikrobiellen Umwelten konfrontiert. Nicht selten ist *D. melanogaster* darüber hinaus künstlichen vom Menschen ausgebrachten, insektiziden Stoffen ausgesetzt. Hierbei ist häufig nicht sie der Zielorganismus (WILSON 2001) sondern ein anderes (Schad-)Insekt, welches im selben Habitat lebt. Da bei der Verwendung von Insektiziden der Zeitpunkt der ersten Ausbringung in die Umwelt i.d.R. bekannt ist, lassen sich an Hand von etablierten Resistenzen evolutive Prozesse zeitlich nachverfolgen (DENHOLM et al. 2002). Beispielsweise wurden 17 Jahre nach Entwicklung (1946) des Insektizids *DDT* (Dichlordiphenyltrichlorethan) die ersten Resistenzen in *Drosophila* Populationen festgestellt (DENHOLM et al. 2002). Ein einzelnes P450 Gen

Box 2-1 Resistenz oder Toleranz?

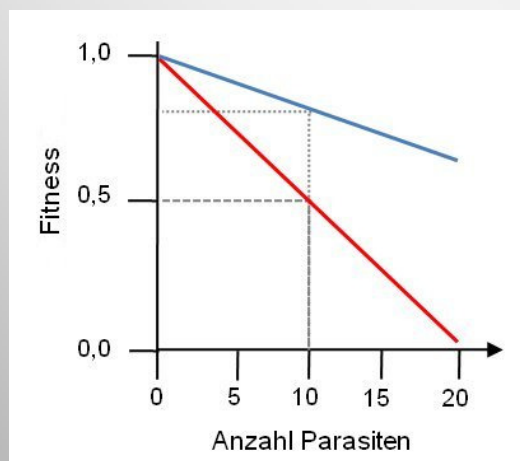
Infizierte Wirtsorganismen haben zwei Möglichkeiten, sich vor dem durch einen Parasiten verursachten Schaden zu schützen: Sie können den Parasiten direkt angreifen und auf diese Weise die Parasitenbelastung reduzieren, oder sie können das Ausmaß der Schädigung, die durch einen Parasiten verursacht wird einschränken. Diese beiden Mechanismen wurden von Botanikern als „Resistenz“ und „Toleranz“ bezeichnet (RÅBERG et al. 2009).

„**Resistenz**“ kann hierbei beschrieben werden als die Fähigkeit eines Wirtes, die Parasitenbelastung einzuschränken. Resistenz schützt den Wirt auf Kosten des Parasiten, da der Parasit durch die Aktivität seitens des Wirtes eine Einbuße in seiner Fitness erfährt (RÅBERG et al. 2009). Die Reaktion des Wirtes kann auf vielfältige Weise erfolgen. Durch Produktion von toxischen Stoffen, durch Bildung von Schrecksubstanzen, durch Synthese von volatilen Lockstoffen, die auf tritrophischer Ebene Prädatoren des Antagonisten anlocken.

Resistenz wird klassischerweise indirekt gemessen als die Umkehr der Parasitenbelastung (Anzahl der Parasiten pro Wirt oder Wirtsgewebe); eine niedrigere Parasitenbelastung bedeutet demgemäß eine höhere Resistenz des Wirtes.

„**Toleranz**“ kann beschrieben werden als die Fähigkeit eines Wirtes, die Schädigung (d.h. Fitness-einbuße), die durch eine Parasitenbelastung verursacht wird, einzuschränken. Toleranz schützt den Wirt vor Schädigungen durch den Parasiten, ohne direkten negativen Einfluss auf den Parasiten (die Fitness des Parasiten) (RÅBERG et al. 2009). Der Toleranz können Mechanismen wie Toxinabbau, gesteigerte Reparaturaktivität, gesteigertes Wachstum etc. zu Grunde liegen.

Toleranz wird klassischerweise gemessen als die Steigung der Regressionskurve, die sich bei einem Zusammenhang zwischen der Fitness eines Wirtes und dem Ausmaß der Parasitenbelastung erstellen lässt. Je steiler die Kurve ist (je größer die Steigung der Kurve ist), desto niedriger ist die Toleranz eines Wirtes (siehe unten stehende Abbildung).



(*Cyp6g1*) erwies sich als verantwortlich für die gesteigerte Resistenz gegenüber DDT (DABORN et al. 2002, JOUBEN et al. 2008). Dieses Gen vermittelt wiederum weitere Resistenzen gegenüber anderen Insektiziden. Die veränderte Transkriptionsrate von *Cyp6g1* wurde in mehreren *D. melanogaster* Linien gefunden, hervorgerufen durch die Insertion eines transposablen Elementes, welches in den verschiedenen Linien bemerkenswerte Übereinstimmungen zeigt. Dies weist auf eine einmalige Entstehung und anschließende Ausbreitung dieses Allels hin (DENHOLM et al. 2002). An Entgiftungsreaktionen von Toxinen allgemein sind jedoch mehrerer Enzyme aus der Familie der Cytochrom P450 Gene beteiligt (DABORN et al. 2007).

Auch eine künstlich gesteigerte Resistenz gegenüber Mykotoxinen wie Aflatoxin ist in Selektionsexperimenten mit *Drosophila* Populationen im Labor gelungen (MELONE & CHINNICI 1986). Dies zeigt, dass genetisches Potential und Variation zur Etablierung von Resistenzen vorhanden sind.

***Drosophila* und *Aspergillus* – Modellorganismen als evolutionsökologisches Modellsystem**

Drosophila melanogaster war einer der ersten Organismen, dessen Genom vollständig sequenziert wurde. Als „Modellorganismus“ wurde *D. melanogaster* von verschiedenen Fachgruppen mit unterschiedlichen Fragestellungen untersucht. Dadurch liegen zahlreiche Informationen über die Gene und ihre Funktionen, die Entwicklungsprozesse, das Immunsystem und seine Reaktionen usw. vor. Viele ökologische Interaktionen von *D. melanogaster* mit biotischen Faktoren ihrer Umwelt sind bislang hingegen noch ungeklärt.

Gleiches gilt für Schimmelpilze aus der Gattung *Aspergillus*. *Aspergillus nidulans* dient im Bereich der Mykologie als Modellorganismus, überwiegend zur Untersuchung der Genregulation. Viele vernetzte Regulationsmechanismen des Sekundärmetabolismus konnten bislang entschlüsselt werden. Dessen ungeachtet kommen stetig neue Informationen hinzu. Modelle werden verfeinert oder ggf. infolge neuer Erkenntnisse korrigiert.

Aufgrund der immensen gesundheitlichen Bedeutung der Sekundärmetabolite als Antibiotika oder Kontaminanten in Nahrungsmitteln und der opportunen Pathogenität von *A. fumigatus* und *A. flavus* gegenüber dem Menschen, stehen auch zu diesen Organismen zahlreiche Studien sowie genetisch gezielt manipulierte Linien dieser Arten zur Verfügung. Die ökologische Funktion der Sekundärmetabolite/Mykotoxine für den produzierenden Organismus ist jedoch bisher weitestgehend ungeklärt (FOX & HOWLETT 2008, KEMPKEN & ROHLFS In press, corrected proof).

Die Kombination der beiden Modellorganismen *D. melanogaster* und *A. nidulans* zu einem Modellsystem bestehend aus einem saprophagen Insekt und einem filamentösen ebenfalls saprophag lebenden Pilze, bietet folglich eine Fülle zur Verfügung stehender Informationen und molekularbiologischer Techniken. Somit können ökologische Phänomene taktisch in diesem System experimentell untersucht und schlüssige Informationen zur Rolle von pilzlichen Sekundärmetaboliten gesammelt werden.

Ziel der Arbeit

Die grundlegende Annahme, die zur vorliegenden Arbeit motivierte, ist, dass die Hauptfunktion der von Schimmelpilzen gebildeten Sekundärmetabolite in der Verteidigung von Ressourcen gegenüber tierischen Konkurrenten, wie z.B. *Drosophila*-Larven, liegt.

Welche Auswirkungen hat die Anwesenheit der Schimmelpilze auf die Entwicklung und das Überleben von *D. melanogaster*-Larven? Unterscheiden sich die Auswirkungen verschiedener Pilzarten, die ein unterschiedliches Spektrum an Sekundärmetaboliten produzieren können? Sind die Sekundärmetabolite hauptverantwortlich für eine gesteigerte Mortalität unter den Larven? Wie wirkt sich die Anwesenheit von *D. melanogaster*-Larven auf das Wachstum der Pilze aus?

Können die Toxine der Pilze negative Einflüsse der Insektenlarven vermindern? Kann durch wiederkehrende Konfrontation mit giftigen Schimmelpilzen in Fliegenpopulationen eine Resistenz/Toleranz evolvieren?

Diese Fragen sollen in der vorliegenden Arbeit beantwortet werden. Dazu wurden in unterschiedlichen Experimenten die beiden Antagonisten Insekt (*Drosophila melanogaster*) und Schimmelpilz (aus der Gattung *Aspergillus*) miteinander konfrontiert und die Auswirkungen auf verschiedene Fitnessparameter der jeweiligen interagierenden Organismen gemessen. Hierzu wurden Untersuchungseinheiten etabliert, die eine einfache Handhabung und präzise Manipulation zulassen und zugleich für beide Antagonisten geeignete Wachstumsbedingungen bieten.

3. Sekundärmetabolite – Signale und Verteidigung von Pilzen und Pflanzen

Wirkungsweise und Abbau von Toxinen

Toxisch wirkende Stoffe, wie beispielsweise Mykotoxine, werden in Tieren durch mehrere Cytochrom P450 Enzyme ab- bzw. umgebaut um eine Verminderung der Toxizität und eine vereinfachte Ausscheidung zu ermöglichen. Erreicht wird dieses z.B. durch Hydroxylierungs-Reaktionen oder die Bildung von Glutathionen durch die Glutathion-S-Transferasen (MCLEAN & DUTTON 1995, NIU et al. 2008). Bei den Umbaureaktionen können jedoch Zwischenprodukte entstehen, die weitaus toxischer sind als ihre Ausgangsmoleküle (Bioaktivierung). So wird AF_{B1} in Vertebraten durch P450 und Lipooxygenasen zu AF_{B1}-8,9-exo-epoxid (AFBO) umgeformt (UENG et al. 1995). Die Detoxifizierung von AFBO wird durch anschließende Konjugation mittels Glutathion-S-Transferase zu Glutathion fortgesetzt und ausgeschieden.

Die Bioaktivierung von AF_{B1} zu AFBO findet in Vertebraten relativ häufig statt (LEE & CAMPBELL 2000). AFBO ist ein hochreaktives Molekül, welches an die DNA bindet, hierdurch die Replikation stört und zu Mutationen führt (EATON & GALLAGHER 1994, MCLEAN & DUTTON 1995, GUENGERICH et al. 1998). Dies geschieht durch Bildung eines Adduktes bei dem das C8-Atom des AFBO an ein Guanin in der DNA bindet. Im Verlauf der DNA-Replikation wird als Folge daraus Guanin durch Thymin ausgetauscht (AGUILAR et al. 1993, JOHNSON & GUENGERICH 1997, WANG & GROOPMAN 1999). AF_{B1} kann jedoch auch direkt in weniger toxische Produkte umgeformt werden.

AFBO wurde bisher nicht in Insekten gefunden, was eine Anpassung von Insekten sein kann, die häufig mit AF_{B1} kontaminierter Nahrung konfrontiert sind (LEE & CAMPBELL 2000), aber auch hier kann Bioaktivierung stattfinden. Ein Beispiel dazu: Durch Piperonyl-Butoxid (PBO) werden P450 Enzyme gehemmt. Bei gleichzeitiger Gabe des Enzymhemmers PBO und AF_{B1} überleben mehr Individuen von *Helicoverpa zea* (Baumwollkapselbohrer) als bei alleiniger Gabe des Mykotoxins (ZENG et al. 2006). Auch in *Drosophila* wurde Bioaktivierung, vermittelt durch das P450 Enzym Cyp6A2, gefunden. AF_{B1} wird hierbei so verändert, dass es Genstrukturen umbauen kann (SANER et al. 1996).

Desweiteren kann die Kombination mehrerer Toxine synergistische Effekte auslösen. Die Kojic Säure z.B. wirkt allein wenig letal auf *Spodoptera frugiperda* (Eulenfalter), erhöht aber die Toxizität von Aflatoxin im gleichen Organismus um mehr als das 4,5fache (DOWD 1988).

Interaktionen zwischen Pflanzen und Herbivoren

Die Verteidigungsstrategien und –mechanismen in Pflanzen gegenüber Schädigung von Herbivoren und Pathogenen sind zum jetzigen Zeitpunkt bei weitem nicht erschöpfend jedoch vertiefter untersucht worden als die Interaktion von Insekten mit Schimmelpilzen. Die verstärkten Bemühungen in diesem Bereich sind vermutlich auf wirtschaftliche Interessen zurückzuführen, da bei Nutzpflanzen ein jährlicher Ernteverlust von 13% durch Herbivorie und ein etwa ebenso großer Anteil (12%) durch Pflanzenpathogene festzustellen ist (PIMENTEL 1991). Ein direkter Vergleich zwischen Pflanzen und Schimmelpilzen in ihren Strategien ist im Detail sicherlich unzulänglich. Jedoch bietet es sich an, die vorhandenen Erkenntnisse über die Mechanismen der Insekten-Pflanzen-Interaktion, die von äquivalenten Ursachen, u.a. Prädation und Konkurrenz, ausgehen, genauer zu betrachten, um evtl. Rückschlüsse auf Insekten-Pilzinteraktionen ziehen zu können.

Pflanzen, ebenso wie Pilze, sind sesshafte Organismen die, wenn sie sich an einen Standort angesiedelt haben, diesen nicht wieder verlassen können und somit sowohl den abiotischen Bedingungen als auch dem Auftreten von Prädatoren oder Konkurrenten ausgesetzt sind. Im Pflanzenreich haben sich folglich verschiedene Strategien entwickelt, die eine Schädigung durch Herbivorie oder Einfluss von Konkurrenten (mittels Allelopathie) vermindern. So z.B. die Ausbildung einer verstärkten Kutikula die z.T. mit Trichomen (Pflanzenhaaren) oder Dornen bewährt oder von einer Wachsschicht überzogen ist und so die Aufnahme als Nahrung für viele Pflanzenfresser unattraktiv macht.

Diesem als passiv zu bezeichnenden System gegenüber steht eine aktive Form, bei der die Pflanze auf metabolischer Ebene, z.T. äußerst artspezifisch, auf durch Herbivore hervorgerufene Verletzungen reagiert. Als Induktoren (Elicitoren) dienen hier oftmals Moleküle die sich im oralen Sekret der Herbivoren befinden und beim Fraßvorgang in die Wunde eingebracht werden, aber auch Stoffe, die bei der Eiablage mit übertragen werden, können Auslöser einer Reaktion seitens der Pflanze sein. Zusammengefasst werden diese Stoffe als HAMPs (*herbivory associated molecular patterns*) bezeichnet (WU & BALDWIN 2009). Heil argumentiert jedoch, dass die chemische Verteidigungsreaktion der Pflanzen eher durch eine Selbsterkennung der zerstörten Strukturen ausgelöst wird, die dadurch zu Stande kommt, dass interzelluläre Moleküle mit Enzymen in Kontakt kommen, von denen sie zuvor durch Kompartimentierung getrennt waren (HEIL 2009). Eines seiner Argumente ist, dass bisher nur 4 Klassen von Elicitoren gefunden wurden, es aber weitaus mehr spezifische Reaktionen gibt und diese Elicitoren, z.B. Inceptin, Derivate pflanzlichen Ursprungs sind.

Dennoch, Pflanzen sind in der Lage Schädigung zu erkennen, sei es durch endogen produzierte oder von außen eingetragene Signalmoleküle, und ausgehend davon eine Reaktionskaskade zur Verteidigung zu aktivieren.

Bei den zur Verteidigung synthetisierten Stoffen kann es sich u. a. um Toxine (DUFFEY & STOUT 1996, KEINANEN et al. 2001, TSCHARNTKE et al. 2001) oder Protease-Inhibitoren handeln, die in den Metabolismus der Herbivoren eingreifen und dort die Verdauung und so die Nutzbarmachung der aufgenommenen Substanzen verlangsamen (FARMER & RYAN 1992, KOIWA et al. 1997). Eine weitere Gruppe der *direkten Antwort* stellen die antimikrobiellen Peptide, z.B. das pflanzliche Defensin (PENNINCKX et al. 1998), dar, welche direkt die Anzahl der Antagonisten reduzieren. Weitere Gruppen von Sekundärmetaboliten sind u.a. Alkaloide, Terpenoide, Flavonoide, die in verschiedenen Pflanzenarten in unterschiedlicher Form vorkommen (BLECHERT et al. 1995, MEMELINK et al. 2001).

Eine weitere induzierte Reaktion ist der programmierte Zelltod, bei dem einzelne Bereiche z.T. aber auch ganze Blätter einer Pflanze absterben und so das weitere Ausbreiten von z.B. Pilzen auf den gesamten Organismus verhindern (BLECHERT et al. 1995).

Die in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen *direkten Antworten* können durch eine *indirekte Antwort* ergänzt werden. Hierbei werden durch die Emission von volatilen Stoffen (VOC, *volatile organic compounds*), die in einer artspezifischen Zusammensetzung vorkommen, Prädatoren oder Parasitoide der Herbivoren (*tritrophische Ebene*) angelockt, (TURLINGS et al. 1990, ARIMURA et al. 2005). Die Freisetzung von volatilen Stoffen, die über Luftbewegungen verbreitet werden (KARBAN et al. 2006), erfolgt meist systemisch (HEIL & TON 2008) und kann bei benachbarten Pflanzen ebenfalls zu einer Aktivierung von physiologischen Veränderungen führen (FARMER & RYAN 1990, HEIL 2008). Dabei kann die Signalweiterleitung über die Luft auch ergänzend zur Weiterleitung von Signalen innerhalb des vaskulären Systems einzelner Pflanzen wirken. Wasserlösliche Stoffe können über die Wurzeln an die Umgebung abgegeben,

von anderen Pflanzen aufgenommen werden, und zu einer Reaktion, z.B. zur Produktion von volatilen Stoffen, führen (DICKE & DIJKMAN 2001).

Anpassung und Gegenanpassung

Im Laufe der Evolution kam es bei Pflanzen und Herbivoren zu Prozessen der Anpassung und Gegenanpassungen (KARBAN & AGRAWAL 2002). Einigen Insekten können die von ihren Wirtspflanzen produzierten toxischen Sekundärmetabolite in ihrem Körper einlagern, um sich ihrerseits vor Prädatoren zu schützen, wie das Beispiel des Jakobsbären, *Tyria jacobaeae*, zeigt, dessen Raupen auf *Senecio jacobea* spezialisiert sind (HARTMANN 1999, MACEL et al. 2002), eine Pflanze, die Pyrrolizidin-Alkaloide zu ihrem Schutz synthetisiert.

Ein weiteres Beispiel einer Anpassung zeigt *Helicoverpa zea* (Baumwollkapselbohrer), die Signalstoffe ihrer Wirtspflanzen nutzt um im Voraus die Synthese von detoxifizierenden Enzymen (P450) zu steigern, als Vorbereitung auf die kommende Konfrontation mit Toxinen (LI et al. 2007).

In der Interaktion zwischen der Augenbohne (*Vigna unguiculata*) und herbivoren Raupen (*Spodoptera frugiperda*) nutzt die Pflanze einen Stoff (*Inceptin*), der sich im Speichel der Tiere befindet. *Inceptin* wurde im Oralsekret von Herbivoren gefunden. Es ist ein proteolytisch verdautes Protein-Derivat der chloroplastischen ATP-Synthase γ -Untereinheit (cATPC). *Inceptin* induziert die Produktion von Jasmonsäure, was zu einer Verteidigungsantwort in der Pflanze führt (siehe unten). cATPCs werden im Mitteldarm der *S. frugiperda* Raupen zu *Inceptin* verdaut. Gelangt *Inceptin* während des Fressvorgangs über den Speichel der Tiere in die Wunde der Pflanze, erfolgt von den Pflanzen eine induzierte Antwort durch Produktion von Jasmonsäure, was bereits 30 Minuten nach Einbringung messbar ist (SCHMELZ et al. 2007).

Die gesamten beschriebenen Mechanismen können Kosten verursachen, die durch die Synthesewege entstehen, durch Speicherung aber auch durch Fixierung von z.B. Stickstoff in Verteidigungssubstanzen, welcher somit anderen metabolischen Reaktionen nicht mehr zur Verfügung steht, oder durch Abgabe volatiler Stoffe an die Umgebung, die folglich der weiteren Metabolisierung verloren gehen (BALDWIN et al. 1994, HOBALLAH et al. 2004). Daher ist eine zeitlich und räumlich gerichtete Regulation der z.T. komplexen und Kosten verursachenden Reaktionskaskaden (TIAN et al. 2003), die ultimativ eine Reduktion der eigenen Fitness durch Einbußen im Wachstum und der Reproduktion hervorrufen können, evident.

Das Beispiel Jasmonsäure – Nutzen und Kosten

Die Jasmonsäure (JA, *jasmonic acid*) ist ein Phytohormon, welches neben zahlreichen regulatorischen Funktionen bezüglich des Wachstums und der Alterung von Pflanzen eine Funktion in der Signalübertragung innerhalb der Pflanze ausübt. JA und seine Derivate (eine wichtige Rolle spielt hier die methylierte Form) sind Fettsäurederivate (Oxylipine) und fungieren als (Langstrecken-) Signalmoleküle resultierend aus zahlreichen abiotischen und biotischen Stressantworten (BLÉE 2002, HALITSCHKE & BALDWIN 2004, PAUW & MEMELINK 2005, WASTERACK 2005).

JA ist ein im Pflanzenreich weit verbreitetes Wundhormon, das verschiedene Immunreaktionen induziert. Ausgelöst wird diese durch Elicitoren, die bei einer äußeren Verletzung, z.B. hervorgerufen durch Herbivoren, in die Wunde eingetragen werden. In diesem Prozess wird die Synthese diverser Substanzen gesteigert, die an der Verteidigungsreaktion beteiligt sind (WASTERACK & PARTHIER 1997).

Diese Art der Verteidigung verursacht Kosten, wie BALDWIN in einem Freilandexperiment zeigen konnte. Durch Zugabe von methylierter Jasmonsäure (MeJA) wurde in *Nicotiana attenuata* die Nikotinproduktion gesteigert. Waren behandelte und Kontroll-Pflanzen dem Fraßdruck

durch Herbivoren ausgesetzt, so konnten die zuvor mit MeJA behandelten Pflanzen eine größere Anzahl an Samen produzieren als die Kontrollpflanzen. In Abwesenheit des Fraßdrucks waren jedoch die Kontrollpflanzen im Vorteil und bildeten eine größere Anzahl an Samen (BALDWIN 1998). Dies lässt darauf schließen, dass die über JA ausgelöste Reaktionskaskade im Falle von Fraßdruck in *N. attenuata* eine Verteidigungsfunktion übernimmt, dass diese jedoch auch kostenintensiv ist. Daher bietet die Etablierung einer zeitlich begrenzten Synthese dieser Metabolite, realisiert durch eine von außen kommende Induktion (Elicitoren), einen evolutiven Vorteil in der Ressourcenschonung zu Zeitpunkten niedrigen Herbivorendrucks.

Im Groben lassen sich die physiologischen Veränderungen einer Pflanze, die von Herbivoren attackiert wird, als einen Wechsel von Wachstum zu Verteidigung beschreiben. Gene zur Synthese von Jasmonsäure, anderen Induktoren und Wundsignalen, Gene zur Produktion von Proteininhibitoren und Pathogenresistenzgene werden vermehrt exprimiert, wohingegen Gene des Primärmetabolismus und der Photosynthese herunter reguliert werden (VOELCKEL & BALDWIN 2004).

Ob die oben komprimiert beschriebenen und beispielhaft aufgezählten Mechanismen zum Schutz gegen Prädatoren und zur Verminderung von Konkurrenz ebenso in einem ähnlichen System bei Pilzen evolviert sind, ist bis zum jetzigen Zeitpunkt ungeklärt. Komplexe Regulationsmechanismen des Sekundärmetabolismus der Pilze sind in Teilen bekannt, es ist jedoch offen, ob diese in derselben Weise auf Reize (Verletzung, Elicitoren etc.) aus der Umwelt reagieren, wie es bei Pflanzen der Fall ist. Die funktionellen und strukturellen Übereinstimmungen pflanzlicher und pilzlicher Oxylipine als Signalüberträger (BUROW et al. 1997, CALVO et al. 1999) und die potenziell gegenseitige Beeinflussung über diese Signalträger (TSITSIGIANNIS & KELLER 2006), gibt Raum zur Vermutung frei, dass das System an der Basis einen gemeinsamen weit zurück liegenden Ursprung hat.

4. Biologie der Modellorganismen und generelle Methodik

4.1. *Drosophila melanogaster*

Verbreitungsgeschichte von *D. melanogaster* – Anpassung und Toleranz

Drosophila melanogaster MEIGEN ist eine auf allen Kontinenten (Ausnahme Antarktika) verbreitete, sich saprophag ernährende Fliege (Diptera) [im Folgenden wird mit der Bezeichnung



4-1 *Drosophila melanogaster*
männliches Adulttier

Drosophila melanogaster Bezug auf die Art genommen; ist die Artenuntergruppe *Drosophila melanogaster* gemeint, wird dieses explizit angemerkt]. Ursprünglich war sie in Zentral- bis Südafrika endemisch, hat sich jedoch von dort aus im Gefolge des Menschen weltweit ausgebreitet (LACHAISE & SILVAIN 2004) und den Status eines kosmopolitischen Organismus erhalten.

Aus der *Drosophila melanogaster* Artenuntergruppe, bestehend aus neun Schwesterarten (DAVID et al. 2007), konnten sich nur zwei Arten, *D. melanogaster* und *D. simulans*, über das afrotropische Ursprungsgebiet hinaus ausbreiten (KELLER 2007). Ihre starke und schnelle Ausbreitung - innerhalb weniger Jahre hat sie große Teile des nordamerikanischen Kontinents besiedelt und wurde dort zur dominierenden Art - zeigt ihr hohes Potential, sich an neue Umwelteinflüsse anzupassen.

Eine derart starke Ausbreitung wird durch bestimmte Eigenschaften begünstigt: Zum einen eine kurze Generationszeit, kombiniert mit einer hohen Anzahl an Nachkommen, und die Fähigkeit sich fortbewegen zu können; all diese Eigenschaften sind auch bei *D. melanogaster* gegeben. Zum anderen ist Toleranz gegenüber veränderlichen Umwelteinflüssen, wie z.B. die Temperatur, und Flexibilität in der Wahl der Nahrungsquelle unbedingte Voraussetzung für eine schnelle Expansion in neue Habitate. Widerspiegeln kann sich diese Toleranz und Anpassung in der genetischen Vielfalt innerhalb einer Art. Diese Vielfalt kann in einer heterogenen Umwelt von Vorteil sein und erhalten bleiben.

Hingegen können Arten die auf ein bestimmtes Habitat oder eine bestimmte Ressource spezialisiert sind, eine geringere genetische Vielfalt zeigen, die sie daran hindert, neue Gebiete mit anderen abiotischen und biotischen Bedingungen zu besiedeln (HOFFMANN & PARSONS 1993, HOFFMANN et al. 2003, KELLERMANN et al. 2006, VAN HEERWAARDEN et al. 2008, KELLERMANN et al. 2009). Beispielsweise ließen sich *Drosophila* Arten mit einer geringen Trockenstresstoleranz in Selektionsexperimenten nicht auf eine erhöhte Trocken-Toleranz selektieren (KELLERMANN et al. 2009) und zeigten somit indirekt ein geringes Potential sich neuen Gegebenheiten anzupassen.

Dies kann bedeuten, dass Arten die ausschließlich in einem bestimmten Areal vorkommen, nicht unbedingt auf die in diesem Gebiet herrschenden Bedingungen spezialisiert sind, sondern sie können auch auf diese beschränkt sein.

Eine Habitat-Erweiterung kann auch durch gerichtete Selektion und den Neuerwerb von Eigenschaften erreicht werden. Diese evolvierten Merkmale sollten dann jedoch mit einer erhöhten Resistenz/Toleranz einhergehen (KELLERMANN et al. 2009).

Entwicklungsablauf von *D. melanogaster*

D. melanogaster ist ein holometaboles Insekt, welches sich über drei Larvenstadien und ein Puppenstadium zur Imago entwickelt. Bei 25°C dauert die Embryonalentwicklung im Ei ca. 24 Stunden. Ebenso dauern, bei ausreichender Nährstoffverfügbarkeit (*ad libitum*), die beiden darauffolgenden Larvenstadien (L1 und L2), in denen die Larven täglich bis zum 3fachen ihres eigenen Körpergewichtes an Nahrung zu sich nehmen (ASHBURNER 1989), jeweils ca. 24 Stunden. Während des ersten Larvenstadiums fressen die Larven überwiegend auf der Oberfläche des Substrates. Mit Beginn des zweiten Larvenstadiums vergraben sie sich in das Medium, wobei sie Gänge zur Oberfläche freihalten, um eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff zu erhalten. In dieser Phase sind häufig nur die caudalen Enden der Larve an der Substratoberfläche zu sehen.

Das dritte Larvenstadium erstreckt sich etwa über 48 h, zu dessen Ende hin die Larven mit dem Wandern beginnen. Hierbei suchen sie, wenn möglich, einen geeigneten Ort für die Verpuppung auf. In dieser Phase nehmen sie keine Nahrung mehr zu sich.

Das Puppenstadium dauert etwa 4 bis 4½ Tage, bis aus der Puppe eine adulte Fliege schlüpft. Nach 2-3 Stunden sind die Flügel entfaltet, das Chitin-Skelett ausgehärtet und vollständig pigmentiert. Die Paarungsbereitschaft setzt nach beendeter Aushärtung des Chitins ein, somit schon ein paar Stunden nach dem Schlupf der Fliege. Sie beginnt mit einem komplexen Balzritual, dem, bei Erfolg, die Kopulation folgt. Die höchste Eiproduktionsrate haben *D. melanogaster* Weibchen zwischen dem 4. und 15. Lebenstag (ASHBURNER 1989).

Habitat und Ernährung – Assoziation mit Hefen

Drosophila hält sich häufig in der Nähe von Früchten auf. Zu bestimmten Jahreszeiten ist sie überall dort wo Obst zur Verfügung steht omnipräsent. Auf den Früchten als Substrat allein können sich ihre Larven jedoch nicht entwickeln (DOBZHANSKY et al. 1956, DORSCH 2007). Grund dafür ist, dass *Drosophila* keine Sterine, biochemisch wichtige Bestandteile von Membranen, synthetisieren kann und daher auf die Aufnahme dieser Stoffe mit der Nahrung angewiesen ist. Überwiegend geschieht dies durch die Aufnahme von Hefen oder Bakterien. Einige *Drosophila* Arten sind zudem in der Lage, Sterine aus Pflanzen zu nutzen (KEARNEY & SHORROCKS 1981), *D. melanogaster* zählt allerdings nicht zu ihnen. Desweiteren ist *D. melanogaster* stark negativ korreliert mit der Abundanz von Bakterien, hingegen kann keine konsistente Assoziation, positiv wie negativ, mit Schimmelpilzen beobachtet werden (OAKESHOTT et al. 1989).

D. melanogaster bevorzugt bei ihrer Wahl des Eiablagesubstrates fermentierende Früchte wie Äpfel, Grapefruits, Orangen und Pflirsiche, aber auch auf Bananen, Limonen und Pflaumen (ATKINSON & SHORROCKS 1977) kommt sie vor. Weniger häufig findet man sie hingegen auf Gemüsesorten.

Die Wahl des Substrates kann mit einer divergierenden Verfügbarkeit verschiedener Hefearten zusammenhängen, die auf verschiedenen Fruchtarten mit unterschiedlicher Häufigkeit vorkommen. Einfluss hierbei hat z.B. der pH-Wert des Substrates/der Früchte auf die Artenzusammensetzung der mikrobiellen Flora (OAKESHOTT et al. 1989). Des Weiteren führt eine unterschiedliche Alkoholtoleranz verschiedener *Drosophila* Arten zu einer unterschiedlichen Verteilung (GIBSON et al. 1981). Ferner kann eine Präferenz für verschiedene Hefen durch eine unterschiedliche Förderlichkeit verschiedener Hefearten auf diverse Fitness-Parameter von *Drosophila* erklärt werden. Hierbei kann sich die Nahrungsquelle von Larven und adulten Fliegen unterscheiden (CARSON et al. 1956, ANAGNOSTOU et al. 2009).

Die Assoziation von *Drosophila* mit Hefen ist nicht ausschließlich geprägt durch die Hefe als Nahrungsgrundlage und Sterin-Lieferant für die Fliegen, sondern auch durch die Fliege als Transportmittel (Vektoren) für die Hefen (GILBERT 1980). Hefen können sich nicht selbstständig oder durch den Wind ausbreiten und sind daher auf tierische Transporter als Vektoren angewiesen. Die Hefen profitieren vom Transport durch die Fliegen, da sie so neue Gebiete erreichen. Die Fliegen wiederum profitierten, da sie aktiv die mit ihnen assoziierten Hefearten in die Substrate ihrer Nachkommen einbringen können. Diese für beide vorteilhafte Assoziation lässt eine Ko-Adaptation von *Drosophila* und Hefen zu einem mutualistisch wirkenden System vermuten (STARMER & FOGLEMAN 1986). Hierbei ist zu beobachten, dass die Anzahl der auf den Fliegen gefundenen Hefearten in etwa mit denen übereinstimmt, die auf Substraten von *Drosophila* gefunden werden (HEED et al. 1976, GANTER et al. 1986). Dies verdeutlicht die assoziative Verbindung der beiden Organismen miteinander, da bestimmte und nicht zufällige Hefearten durch die Fliege verbreitet werden.

Toxinabbau in Insekten und *Drosophila melanogaster*

Insekten benötigen eine effektive Methode mit toxischen Substanzen umzugehen, die von konkurrierenden Organismen (z.B. Schimmelpilzen) zum Schutz und zur Verteidigung ihres Substrates synthetisiert werden können. Neben der Meidung von kontaminierter Nahrung bilden Detoxifizierungs- und Exkretionsprozesse eine Möglichkeit, Schädigung durch Akkumulierung toxischer Substanzen im eigenen Körper zu vermeiden oder respektive zu verringern. Hierbei erfüllen Cytochrome eine wichtige Rolle.

Die Cytochrom P450 Enzyme gehören zu einer großen Familie enzymatisch aktiver Proteine, die an zahlreichen Reaktionen beteiligt sind. Dabei kommen sie in nahezu allen Organismen vor (CHUNG et al. 2009). In Insekten wurden bisher etwa 100 verschiedene P450 identifiziert. Ein Großteil davon vermittelt die Verstoffwechslung toxischer Substanzen, denen Insekten in ihrer Umwelt ausgesetzt sind, zu weniger schädlichen Substanzen bzw. verändert sie so, dass eine Ausscheidung begünstigt ist (CLAUDIANOS et al. 2006). Sie sind desweiteren auch an der Ausscheidung überschüssig aufgenommener Stoffe beteiligt, die keine negativen Auswirkungen auf den Organismus haben.

Die meisten der P450 Enzyme werden im Mitteldarm (29[15]), den Malpighischen Gefäßen (17[3]) und dem Fettkörper (8[2]) exprimiert, was weitere Evidenz für eine Rolle im Abbau von überschüssig aufgenommenen und/oder toxischen Stoffen liefert (CHUNG et al. 2009) (in Klammern: gesamte Anzahl an P450; in eckigen Klammern Anzahl an P450 die exklusiv im entsprechenden Organ exprimiert werden).

Die Expression verschiedener P450-Gene kann sich in unterschiedlichen Entwicklungsstadien von *D. melanogaster* unterscheiden. Das Gen *Cyp6a2*, das an der Insektizid-Resistenz beteiligt ist (BERGÉ et al. 1998), wurde z.B. nur in fressenden, jedoch nicht in wandernden L3 Larvenstadien gefunden (CHUNG et al. 2009). Dies deutet darauf hin, dass das durch *Cyp6a2* kodierte P450 eine Funktion beim Ab- oder Umbau von Insektiziden hat, die mit der Nahrung aufgenommen werden. Im späten L3 Stadium, in dem die Larven zu wandern beginnen und keine Nahrung mehr aufnehmen, ist die Aufrechterhaltung dieser Detoxifikation von Nahrung überflüssig und die Expression wird heruntergefahren.

Einige P450-Gene lassen sich in Gruppen zusammenfassen, deren Genstrukturen stabiler sind als andere. Diese Gene sind vor allem an endogenen Funktionen beteiligt. Desweiteren gibt es Gruppen, die weniger stabil sind. Diese sind überwiegend in Prozesse der Detoxifizierung von Fremdstoffen involviert. Gezeigt wurde dies durch die Sequenzierung von P450-Genen in Vertebraten (THOMAS 2007). Auch im *Drosophila*-Genom wurden diese stabilen und weniger stabili-

len P450-Gengruppen gefunden (CLARK 2007). Die weniger stabilen P450-Gene befinden sich zu 80% in Funktionsbereichen des Mitteldarms, der Malpighischen Gefäße und des Fettkörpers der Fliege, somit in Bereichen der Detoxifizierung. In funktionellen Bereichen anderen Organen zählen nur 27% zu der Kategorie der nicht stabilen P450-Gene (CHUNG et al. 2009). Bereiche mit physiologischer Bedeutung sind daher weniger stark von Mutationen mit möglicherweise negativen Folgen für die Funktion des jeweiligen Gens betroffen.

Vielfältige Entgiftungsmechanismen in Insekten könnten eine Voraussetzung dafür sein, sich auf unterschiedlichsten Bruts substraten erfolgreich zu entwickeln und sich damit über weite Areale auszubreiten.

4.2. *Aspergillus* ssp.

Pilze – Zersetzer und Medikamentenproduzenten

Pilze, eine weltweit verbreitete Organismengruppe mit einer Vielzahl von unterschiedlichen Erscheinungsformen, kommen ubiquitär in fast allen Habitaten, terrestrische wie aquatische (Süßwasser), vor (HAWKSWORTH 2001).

Da Pilze nicht über photosynthetisch aktive Pigmente verfügen, sind sie auf die Aufnahme kohlenstoffhaltigen Materials angewiesen. Dieses erlangen sie durch eine extrazelluläre Verdauung abgestorbenen organischen Materials mit Hilfe der Exkretion von Verdauungsenzymen in ihre Umgebung und anschließender Absorption der erhaltenen Substanzen. Durch diesen Vorgang leisten Pilze einen wichtigen ökologischen Beitrag zum Abbau von abgestorbenem organischem Material, indem sie Substanzen, die sich in dem organischen Material befinden, dem Stoffkreislauf und damit anderen Organismen wieder zugänglich machen. Dies ist eine entscheidende Leistung die Pilze erbringen, da zahlreiche andere Organismen selbst nicht in der Lage sind, diese Substanzen aus der organischen Materie heraus zu lösen. Das Vorhandensein einer großen Vielfalt an bioaktiven Stoffen ermöglicht es den Pilzen unterschiedlichste Habitate zu besiedeln (KELLER et al. 2005).

Pilze treten mit einem vielgestaltigen Habitus auf, wobei der Fruchtkörper bei vielen Arten das prominente Merkmal darstellt. Eines ist allen Pilzen jedoch gemein, nämlich das meist eher unscheinbare Hyphen-Geflecht, welches sich im und auf dem Substrat befindet.

Schimmelpilze bilden keinen großen augenscheinlichen Fruchtkörper aus, sondern wachsen als Hyphen-Geflecht überwiegend auf ihrem Substrat und treten häufig erst mit der Ausbildung von Pigmenten in Erscheinung. Ihre Fruchtkörper werden durch kleine gleichwohl vielgestaltige Strukturen ausgebildet und werden/wurden in der Systematik als Merkmal zur Unterscheidung verschiedener taxonomischer Gruppen herangezogen. Ergänzt und z.T. korrigiert wird diese Methode heute mit Sequenzanalysen (18S rDNA) (WEBSTER & WEBER 2007). Unter dem Begriff *Schimmelpilz*, werden Arten zusammengefasst, die durch ihr filamentöses Wachstum Gemeinsamkeiten aufweisen, jedoch phylogenetisch keinen direkten gemeinsamen Ursprung haben.

Die Zytoplasmabestandteile in den Hyphen von Schimmelpilzen sind nicht homogen über die gesamte Hyphe verteilt, sondern zeigen eine Anordnung bestimmter Organelle von der distalen Hyphenspitze bis zur proximalen Hyphenbasis. Im Apex der Hyphen, der äußersten Spitze, befindet sich eine Kumulation von sekretorischen Vesikeln die in einem Halbkreis eine Ansammlung von Mikrovessikeln umgeben. Zusammengefasst wird diese Formation als *Spitzenkörper* bezeichnet. Dem Spitzenkörper folgt ein Bereich erhöhter biosynthetischer Aktivität gekennzeichnet durch eine Anhäufung von Endoplasmatischen Retikula und Mitochondrien. Weiter proximal

folgen die ersten Zellkerne und ein ausgedehntes System an Vakuolen. Das Wachstum der Hyphen erfolgt am distalen Ende.

Neben der ökologischen Bedeutung als saprophage Organismen und Stickstofffixierer (Mykorrhizen, Wurzelpilze) erlangten Pilze ein großes und steigendes Interesse in der Medizin und Pharmakologie. Pilze verfügen über ein weites Spektrum an bioaktiven Stoffen die z. T. antibiotische aber auch immunsupprimierende Wirkungen aufweisen (KELLER et al. 2005). Die ökologische Funktion dieser Stoffe liegt wahrscheinlich in der chemischen Verteidigung gegen Prädatoren und Konkurrenten (WICKLOW & COLE 1982, ROHLFS et al. 2005, ROHLFS et al. 2007). Sie werden jedoch auch immer zahlreicher in der Medizin verwendet. Die zufällige Entdeckung des Antibiotikums *Penicillin* von Alexander Fleming im Jahre 1929, ausgelöst durch eine „nicht vermeidbare“ Kontamination einer *Staphylococcus* ssp. Kultur (FLEMING 1929), gilt als Katalysator, dem fortlaufend weiteres Interesse an bioaktiven Substanzen aus Pilzen und anderen Mikroorganismen (PETTIT 2009) gefolgt ist. Die Kontamination wurde vom FLEMING als Schimmelpilz zugehörig zur Gattung *Penicillium* identifiziert.

Die Entwicklung und der Einsatz immer neuer Medikamente gegen z.B. bakterielle Krankheitserreger des Menschen, führt auf der Seite der Bakterien zur Etablierung von Resistenzen gegen die verwendeten Wirkstoffe, insbesondere bei missbräuchlicher Verwendung in der Nutztierhaltung und Einbringung in die Umwelt (MARTINEZ 2009). Durch diese Entwicklung werden stetig neue Wirkstoffe benötigt, die in der Pflanzen- und Pilzwelt gesucht werden (VINING 1990).

***Aspergillus* – weitverbreitete Bodenpilze**

Aspergillus Arten sind weit verbreitet im Boden vorkommende Schlauchpilze (WEBSTER & WEBER 2007). Sie sind in der Lage zahlreiche enzymatisch aktive Stoffe zu synthetisieren mit denen sie unterschiedlichste Substrate metabolisieren können (FOGARTY 1994, BOK et al. 2006a). Diese Fähigkeit ermöglicht es ihnen verschiedenste Lebensräume zu besetzen.

Das morphologische Charakteristikum dieser Pilzgattung sind die sporenbildenden Fruchtkörper, die Konidiophoren, welche namensgebend sind. Der katholische Priester Micheli fühlte sich beim Anblick der Konidiophoren an einen Weihwassersprinkler (*Aspergillum*; Latein: asperge = bespritzen) erinnerte (KLICH 2009).



Abb. 4-2 *Aspergillus nidulans*

Aspergillus fumigatus

Aspergillus flavus

Petrischalen 35 mm Ø mit Hefe-Maismehl-Medium (DZM) und jeweils einer Kolonie von *Aspergillus* ssp. mit einem Alter von ca. 4 Tagen.

Die meisten Ascomycota, zu denen die Gattung *Aspergillus* gehört, sind Saprotrophe (KLICH 2009). Sie kommen dabei z.T. fisch auf organischem Material vor (WICKLOW & DONAHUE 1984). Darüber hinaus kommen auch symbiontische und pathogene oder Mischformen vor. Letzteres ist für *A. fumigatus* und *A. flavus* der Fall, die beide neben ihrer saprotrophen Lebensweise auch zu den opportunistischen Pathogenen zählen, und u.a. den Menschen infizieren können.

Innerhalb des menschlichen Immunsystems haben sich in der Evolution effektive Mechanismen herausgebildet um diesen Pathogenen zu begegnen. Immunsupprimierte Menschen hingegen können z.B. von invasiver Aspergillose betroffen sein, was in den vergangenen Jahren merklich zugenommen hat. Ursache hierfür könnte eine gestiegene Anzahl an medizinischen Behandlungen sein, die eine Unterdrückung des Immunsystems notwendig machen (TEKAIA & LATGE 2005). In diesem Zusammenhang stellen Aspergillose Erkrankungen als Folgeerkrankung in Krankenhäusern ein großes Problem dar, bei denen *A. flavus* und vor allem *A. fumigatus* die Hauptauslöser sind. Darüber hinaus wirken viele Aspergillen, die in Häusern z.B. nach einem Wasserschaden an feuchten Wänden vorkommen können, hochgradig allergen (SEGAL & WALSH 2006, VONBERG & GASTMEIER 2006).

Einige Arten der Gattung *Aspergillus* können sich sowohl asexuell (anamorph) als auch sexuell (teleomorph) fortpflanzen. Die anamorphe Fortpflanzung erfolgt in konidiogenen Zellen, die sich, wie bei *A. nidulans*, oft zu mehreren auf einer nach oben gerichteten Konidiophore befinden. Die konidiogenen Zellen stellen terminale Enden von Hyphen dar, die durch Unterteilung mittels Septen in mehrere Kompartimente getrennt werden und sich schließlich als einzelne Tochterzellen, den Koniden (auch Konidiosporen), ablösen.

Die teleomorphe Sporenbildung findet in den namensgebenden Asci statt (Ascomycota, Phylum, das u.a. die Aspergillen enthält). Diese werden von spezialisierten Hyphen gebildet. In den Asci findet nach der Zellkernfusion die Meiose statt. Im Gegensatz dazu werden Konidien ausschließlich durch Mitose produziert (WEBSTER & WEBER 2007).

Box 4-2 Fortpflanzung und Nomenklatur der Pilze

Aspergillus ist per definitionem eine asexuelle Gattung. Einige *Aspergillus* Arten sind jedoch in der Lage, sich sexuell (teleomorph) fortzupflanzen. Dies hat zu einiger Verwirrung geführt, da für eine Art evtl. mehrere Namen vorhanden sind, einer für die anamorphe und einer für die teleomorphe Form.

In der Nomenklatur hat der Name der teleomorphen Form Vorrang (MCNEILL et al. 2006), jedoch haben sich insbesondere bei Modelorganismen die ursprünglicheren Namen durchgesetzt, die schon zahlreich in der Literatur vertreten waren. Dies ist z.B. für *Aspergillus nidulans* (anamorph) der Fall, der in seiner teleomorphen Form *Emericella nidulans* heißt.

In dieser Arbeit werden der Einfachheit halber für alle drei verwendeten Arten durchgehend die anamorphen Namen verwendet, ungeachtet ob teleomorphe Formen vorhanden sind.

Auch die in dieser Arbeit verwendeten Arten, *A. nidulans*, *A. fumigatus* und *A. flavus*, sind weltweit verbreitete im Boden vorkommende Schimmelpilze, wobei *A. flavus* eine Tendenz zu wärmeren Regionen aufweist (ROTH et al. 1990).

A. nidulans (teleomorph: *Emericella nidulans*) war die erste Art aus der Gattung der Aspergillen deren Genom sequenziert wurde (ANDERSEN & NIELSEN 2009). Im Vergleich zu

Box 4-1 Systematik

Stamm: Ascomycota (Echte Schlauchpilze)

Klasse: Plectomycetes

Ordnung: Eurotiales

Familie: Trichocomaceae

Gattung: *Aspergillus* (Gießkannenschimmel)

Art: *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus* und *Aspergillus flavus*

A. fumigatus und *A. flavus*, ist *A. nidulans* die Art mit der niedrigsten Anzahl an bekannten Sekundärmetaboliten. Unter ihnen findet sich das Sterigmatocystin, das auf tierische Organismen toxisch wirkt. Sterigmatocystin ist ein unmittelbares Ausgangsmolekül von Aflatoxin, jedoch wird dieses in *A. nidulans* nicht umgebaut. Sterigmatocystin wird in Lebensmitteln weniger häufig gefunden als das Aflatoxin (KLICH 2009).

Auch *A. fumigatus* existiert in einer teleomorphen Form (*Neosartorya fumigata*) (O'GORMAN et al. 2009). *A. fumigatus* synthetisiert eine größere Anzahl an Sekundärmetaboliten als *A. nidulans*, jedoch kein Aflatoxin oder Sterigmatocystin. Sein bekanntestes Mykotoxin ist das Gliotoxin, ein Alkaloid, das immunsupprimierende (AMITANI et al. 1995) und genotoxische (NIEMINEN et al. 2002) Wirkungen hat. Seine Produktion ist abhängig von der Temperatur und dem Sauerstoffgehalt (CALVO et al. 2002).

Für *A. flavus* ist bislang nur die anamorphe Form bekannt. Er ist ebenfalls in der Lage, verschiedenste Sekundärmetabolite zu synthetisieren. Unter ihnen das Sterigmatocystin, welches zu Aflatoxin umgebaut wird und daher nur in niedrigen Konzentrationen nachgewiesen werden kann. Aflatoxin (AF) kann in verschiedenen Formen gefunden werden, die nach der Farbe ihrer Fluoreszenz unter ultraviolettem Licht (Blau und Grün) unter Angabe der relativen chromatographischen Laufgeschwindigkeit benannt sind (AF_{B1}, AF_{B2}, AF_{G1}, AF_{G2}). Das am häufigsten gefundene Aflatoxin ist das AF_{B1} (MCLEAN & DUTTON 1995). Aflatoxin kann akut toxisch wirken und in geringeren Konzentrationen chronische Schäden hervorrufen. Dabei wirkt Aflatoxin mutagen, verursacht u.a. Fehlentwicklungen der Chromosomen, Chromosomen-strangbrüche und nicht vorgesehene DNA-Synthese (WANG & GROOPMAN 1999). Die Kontamination von Lebensmitteln mit Aflatoxin kann vor der Ernte aber auch bei nicht ausreichend trockener Lagerung entstehen (DIENER et al. 1987).

Aflatoxin verursacht bei *Drosophila* eine verzögerte Entwicklung, bei der einzelne Phasen der Entwicklung verlängert sind. Konzentration, Dauer und Zeitpunkt der Exposition haben einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklungsfähigkeit der Larven. So kann bei einer kurzen Exposition während der L1-Larvalphase die weitere Entwicklung vollzogen werden, jedoch geht sie mit einer erhöhten Mortalität der adulten Fliegen einher (KIRK et al. 1971). Darüber hinaus sind Anzahl an schlüpfenden Fliegen und das Körpergewicht von Weibchen reduziert (CHINNICI et al. 1976).

In der Konfrontation mit Aflatoxin zeigen unterschiedliche Linien von *D. melanogaster* eine unterschiedliche Resistenz gegenüber dem Mykotoxin (LLEWELLYN & CHINNICI 1978, CHINNICI & MELONE 1985), je nachdem, aus welchem Gebiet die Individuen stammten. Diese unterschiedliche Resistenz kann durch unterschiedlich starke und/oder häufige Exposition mit Aflatoxin zusammenhängen. In einem frühen Experiment wurden die für die Resistenz verantwortlichen Gene auf zwei autosomalen Chromosomen verteilt gefunden (CHINNICI 1980).

4.3. Aufrechterhaltung von *Drosophila*-Populationen und *Aspergillus*-Kolonien

4.3.1. Zucht der *Drosophila melanogaster* Populationen

Zwei Labor-Populationen von *Drosophila melanogaster* wurden im Voraus etabliert. Beide stammen aus Wildfängen aus der Umgebung um Kiel und wurden über *Isofemalelinien* erstellt. Dies war notwendig, da eine artspezifische Unterscheidung von *Drosophila melanogaster* und *Drosophila simulans* anhand morphologischer Merkmale nur an den Genitalplatten der männlichen Fliegen erfolgen kann und somit eine Lebendbestimmung nicht möglich ist. Die Populationen werden entsprechend ihres Fangdatums als Kiellinie '03 bzw. Kiellinie '06 bezeichnet.

Beide wurden seit ihrer Etablierung auf Standard *Drosophila* Zucht Medium (Standard DZM) kultiviert, das zu gleichen Teilen Hefehydrolysat, Maismehl und Zucker enthält (siehe Box 4-3). Die Populationen wurden in einer Klimakammer bei 25°C mit einem Tag/Nachtrhythmus von 16:8 Stunden in Populationskästen von mehreren Tausend Individuen gehalten. Um Kontaminationen mit Mikroorganismen zu vermindern, wurden dem Medium nach Dampfsterilisation Antibiotika und Fungizide in zum Teil variierender Kombination beigegeben (siehe Box 4-4).

Box 4-3 Zusammensetzung *Drosophila* Zuchtmedium (DZM)

Menge	Substanz
62,5 g	Hefehydrolysat aus Bierhefe (Laiber GmbH, Bramsche)
62,5 g	Maismehl (Primavera Naturkost GmbH, Mühldorf)
62,5 g	Zucker (Haushaltszucker)
12,5 g	Agar-Agar Kobe I (Roth)
1 L	Wasser

Box 4-4 Antibiotika und Fungizide für *Drosophila* Zuchtmedium

Menge	Substanz	Zugabe
3000 mg	Nipagin (Methyl-4hydroxybenzoate) Sigma Aldrich	stets
1000 mg	Chloramphenicol, Sigma-Aldrich, Steinheim, in Ethanol	wechselnd
1000 mg	Sorbinsäure, Carl Roth, Steinheim, in Ethanol	stets
50 mg	Tetrazyklin, Carl Roth, Steinheim, in Wasser	wechselnd
100 mg	Kanamycin, Carl Roth, Steinheim, in Wasser	wechselnd
100 mg	Nystatin, Carl Roth, Steinheim, in DMSO	stets

Die Zuchtgefäße (165 ml) enthielten etwa 30 ml Standard DZM und wurden mit einer moderaten Anzahl an Eiern bestückt, wodurch *ad libitum* Bedingungen gewährleistet werden konnten. Geschlüpfte Fliegen wurden in die Populationskästen überführt in denen ihnen Wasser und ein Gemisch aus Zucker und Hefehydrolysat als Nahrungsquelle zur Verfügung standen.

Die *Kiellinie* `03 kam in den in Kapitel 5 und 6 beschriebenen Experimenten zum Einsatz. Die *Kiellinie* `06 wurde für die in Kapitel 7 beschriebene Selektion verwendet.

4.3.2. Zucht der *Aspergillus* Linien – Gewinnung von Konidien

Zur Pilzzucht wurde Malzextrakt-Agar (ME-Agar, Carl Roth) verwendet. In 50 mL Zentrifugen-Röhrchen wurden etwa 25 mL dampfsterilisierter ME-Agar gegeben und das Röhrchen bis zur Aushärtung des Agars in einem Winkel von ca. 85° gestellt. Dadurch wurde eine größtmögliche Oberfläche des Mediums erhalten. Konidien wurden entweder in einer NaCl-Lösung auf die Oberfläche pipettiert oder mit einer Impföse von einer andern Kolonie gelöst und auf dem Medium verteilt.

Nach einer Inkubationszeit von 4-6 Tagen wurde eine NaCl-Lösung (0,9%ig), die 0,1% Tween 80 (Polyoxyethylen-80-sorbitanmonooleat, Carl Roth) zur Brechung der Oberflächenspannung enthielt, hinzupipettiert, die Konidien mit Hilfe einer Impföse oder einer Pipettenspitze vorsichtig vom Myzel gelöst und in der NaCl-Lösung bei 4°C aufbewahrt. Die Inkubation fand bei 25°C und einem Tag-/Nachtrhythmus von 14/10 statt.

Für Experimente wurde mittels einer Zählkammer (Neubauer improved) ein Titer von 1000 Konidien pro μL Lösung eingestellt.

Die Pilzlinien von *A. nidulans*, *A. fumigatus* und *A. flavus* (WT, ΔlaeA , $\Delta\text{laeA}::\text{laeA}$), sowie die Oxylipin-Mutanten von *A. nidulans* (WT-*veA*, ΔppoB , ΔppoAC , ΔppoA , ΔppoABC , OE-*ppoA*) wurden freundlicherweise von Nancy P. Keller, Universität von Wisconsin, Madison, USA, und die *A. nidulans* und *A. fumigatus* velvet-Mutanten (WT-*vel*, Δvel) von Gerhard H. Braus, Georg-August Universität von Göttingen, Deutschland, zur Verfügung gestellt (für Linien-Nr. und Genotyp-Bezeichnung siehe Anhang Tab. A1).

4.4. Generelle Bedingungen und Ausführung der Experimente

4.4.1. Sterilisation der Eier

Um Kontaminationen mit unerwünschten Mikroorganismen zu vermeiden, wurden die Eier von *D. melanogaster* vor dem Schlupf der Larven sterilisiert.

Als äußere Schutzhülle sind die Embryonen von *Drosophila* von einem Chorion und darunter von einer Vitellinmembran, einer Lipidmembran, umgeben. Das aus Proteinen (HECK & SPRADLING 1990) bestehende Chorion hat eine raue Oberflächenstruktur an der sich Mikroorganismen anheften können. Um für die Zucht und für experimentelle Untersuchungen sterile Bedingungen zu erhalten, wurde das Chorion mit Hilfe einer Natriumhypochlorid-Lösung (NaOCl, Endkonzentration 6%; Carl Roth), in der sich das Chorion auflöst, entfernt. Hierzu wurden die Eier vom Eiablagemedium abgespült und für 10 Minuten in eine NaOCl-Lösung überführt. Durch diesen Vorgang wird den Mikroorganismen eine Anheftung an den Embryo erschwert, darüber hinaus überlebt ein überwiegender Anteil an Mikroorganismen diese Routine nicht. Im

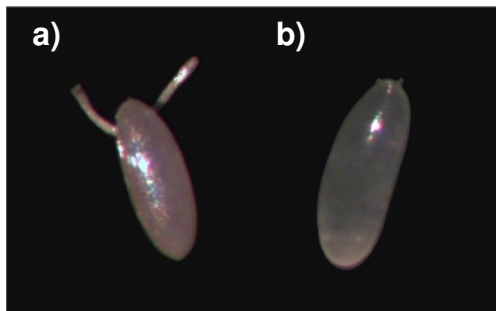


Abb. 4-3 *Drosophila melanogaster* Ei
a) mit Chorion; b) ohne Chorion nach der Behandlung mit Natriumhypochlorid

Anschluss wurden die Embryonen über eine Gaze (100 μm Maschenweite) filtriert und mit sterilem Wasser gründlich gespült um NaOCl-Reste und verbleibende Mikroorganismen zu entfernen. Für experimentelle Untersuchungen wurden die Embryonen bis zum Schlüpfen der Larven (L1 Stadium) zur Feuchthaltung auf nipaginhaltige Agarplatten gelegt und bei 25°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Zur Zucht verwendete Embryonen wurden nach dem Spülen umgehend in Zuchtröhrchen überführt.

4.4.2. Experimentelle Einheiten

Der überwiegende Teil der Konfrontations-Experimente fand in 2 mL Reaktionsgefäßen ohne Deckel statt. Die Reaktionsgefäße waren mit 1 mL *Drosophila*-Zucht-Medium (DZM) gefüllt (ein so vorbereitetes Reaktionsgefäß entspricht einer experimentellen Einheit, Abb. 4-4a). Das DZM bietet den großen Vorteil, dass es sowohl die Entwicklung von *Drosophila*-Larven als auch das Wachstum von *Aspergillus* Pilzen ermöglicht. In den Experimenten wurden dem Medium keine Antibiotika oder Fungizide zugegeben. Diese experimentellen Einheiten sind gut handhabbar und ermöglichen eine Vielzahl von replizierbaren Experimenten die unter kontrolliert Bedingungen ablaufen können. Die Reaktionsgefäße waren mit einem Baumwollstopfen verschlossen. Dies verhinderte zum einen das Entkommen der Larven bzw. Fliegen, zum anderen verminderte es das Eindringen von unerwünschten Organismen und ermöglichte gleichzeitig den Gasaustausch.

Um ein Austrocknen des Mediums zu verhindern, wurden die Reaktionsgefäßständer (Racks) mit den Reaktionsgefäßen in Kunststoffbehälter gestellt, in denen Wasser zur Verdunstung bereit stand (Abb. 4-4b).

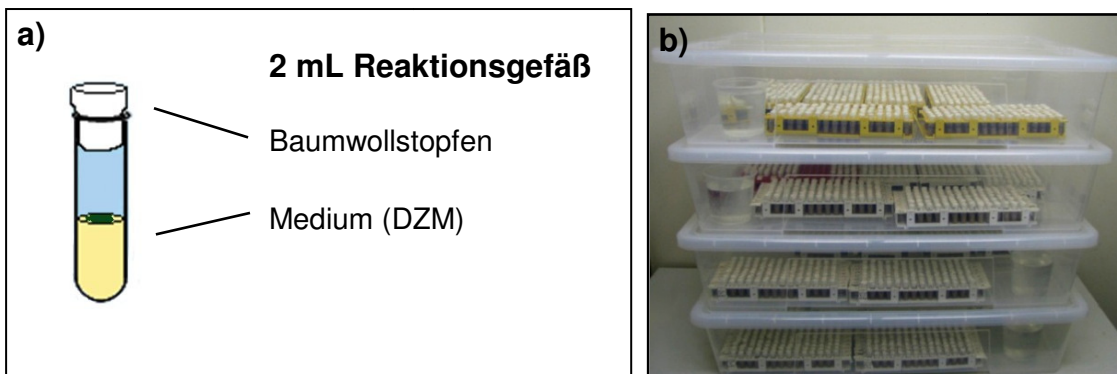


Abb. 4-4 Experimentelle Einheiten

a) bestehend aus einem 2 mL Reaktionsgefäß ohne Deckel, verschlossen mit einem Baumwollstopfen. In dem Reaktionsgefäß befindet sich 1 mL Medium (DZM). **b)** Zur Feuchthaltung stehen die Racks mit den Experimentellen Einheiten in Kunststoffbehältern die eine Wasserquelle enthalten.

Im Regelfall wurden für Experimente je experimenteller Einheit 1000 in 1 μ L NaCl-Lösung suspendierte Konidien auf die Oberfläche des Mediums appliziert. Zu den Kontrollen wurde jeweils 1 μ L Konidien-freier NaCl-Lösung gegeben. Das inokulierte Medium wurde entsprechend des experimentellen Aufbaus für die vorgesehene Dauer vorinkubiert, bevor sterile Larven, zumeist im L1-Stadium, in das Experiment eingesetzt wurden. Die Larven wurden mit einem sterilen Feinhaarpinsel von einer Agar-Platte in die Reaktionsgefäße transferiert.

Die Inkubatoren (RuMed) verfügten über eine Lichtquelle (zwei Leuchtstoffröhren) und wurde ebenso wie die Temperatur über ein Programm gesteuert. Die Einstellungen der Inkubatoren waren 25°C bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 14/10 Stunden bzw. 12/12 Stunden.

5. *Drosophila melanogaster* in Konfrontation mit *Aspergillus* Wildtyp

Konkurrenz ist eine zweiseitig negative Interaktion von in einem Habitat gemeinsam vorkommenden Individuen. Um eine Reduktion der eigenen Fitness zu vermindern, könnten Individuen die Konfrontation mit dem Antagonisten vermeiden. In dem antagonistischen System von *Drosophila* und Schimmelpilzen der Gattung *Aspergillus* können die Fliegenweibchen als aktiv mobiler Part zwischen verschiedenen Brutsubstraten für ihre Nachkommen wählen. Durch die Wahl von Schimmelpilz-freien Substraten könnten sie ihren Nachkommen einen Entwicklungsvorteil verschaffen, da sie so weniger mit toxischen Substanzen konfrontiert würden. Die Frage ob *D. melanogaster* unterschiedliche Präferenzen aufweist, ist u.a. Gegenstand dieses Kapitels. Desweiteren wurde untersucht, in welchem Ausmaß sich die Präsenz von Schimmelpilzen der Gattung *Aspergillus* auf das Überleben von *D. melanogaster* auswirkt. Hierzu wurde das Überleben der Larven anhand der Anzahl geschlüpfter Fliegen gemessen. Durch die gemeinsame Nutzung des Substrates von *D. melanogaster* und Schimmelpilzen während des Larvenstadiums, ist in dieser Phase vom größten Einfluss der Schimmelpilze auf die Fliege auszugehen. Zusammen mit dem Substrat werden Stoffe, die von den Schimmelpilzen in das Substrat sekretiert wurden, aufgenommen und können evtl. in den Larven zu Entwicklungsstörungen oder Entwicklungsverzögerungen führen. Zur Ermittlung von derartigen Einflüssen, die nicht unmittelbar zu einer erhöhten Mortalität der Larven führt, wurde die Entwicklungszeit, die die Larven vom Ei bis zur adulten Fliege benötigten, gemessen.

Die Verwendung verschiedener *Aspergillus* Arten sollte zeigen, ob sich der Einfluss auf das Überleben von *D. melanogaster* zwischen Schimmelpilzarten unterscheidet. Ein Merkmalsunterschied zwischen den gewählten *Aspergillus*-Arten ist die unterschiedliche Zusammensetzung an Sekundärmetaboliten und die Anzahl dieser. Ob es einen möglichen Zusammenhang gibt, wurde hier getestet.

5.1. Konfrontation mit *Aspergillus* WT – Material und Methoden

Eiablageverhalten von *D. melanogaster*

Um zu testen ob *D. melanogaster* Weibchen bei der Wahl ihrer Eiablagesubstrate zwischen Schimmelpilz-bewachsenen und schimmelpilzfreien Substraten diskriminieren, wurden 4 Tage alten Weibchen (jeweils einem pro Replikat) die Wahl zwischen zwei Substratpatches gegeben. Die Weibchen hatten zuvor die Möglichkeit sich mit verschiedenen Männchen gleichen Alters zu verpaaren, verfügten jedoch nicht über Eiablageerfahrung und hatten zuvor keinen Kontakt mit Schimmelpilzen oder dem verwendeten Substrat. Die Patches bestanden aus Petrischalen mit einem Durchmesser von 35 mm die mit 5 mL DZM gefüllt waren. Ein Teil der Petrischalen wurde mit jeweils 1000 Konidien des Wildtyps von *A. nidulans*, *A. fumigatus* bzw. *A. flavus* inokuliert, der andere Teil verblieb ohne Konidien. Die Petrischalen wurden gemeinsam für 72 Stunden bei 25°C vorinkubiert. Jeweils eine mit *Aspergillus* ssp. bewachsene und eine Kontroll-Petrischale wurde in einem durchsichtigen geschlossenen Kunststoffbehälter (Wahlarena, 10 x 7 x 2,5 cm) an gegenüberliegenden Enden platziert (vgl. Abb. 5-1). Ein Teil der Oberfläche der Kontrollpatches wurde mit einem zuvor sterilisierten Filterpapier (Dampfsterilisation) entsprechend der Größe einer drei Tage alten Pilzkolonie abgedeckt. Dies diente der Nachahmung der durch den Pilz eingenommenen Fläche und sollte somit den Einfluss einer größeren zur Verfügung stehenden Oberfläche als Anreiz zur Eiablage vermindern. Durch eine in die Mitte der Wahlarena angebrachten seitlichen Öffnung wurde jeweils ein Weibchen pro Behälter entlassen.

Die Wahlarenen wurden für die Dauer von 18 Stunden inklusive einer Dunkelperiode von 10 Stunden in alternierender Ausrichtung in einem 25°C Inkubator angeordnet (Zusammenfassung siehe Box 5-1). Nach Ablauf der 18 Stunden wurden die Anzahl der Eier pro Patch gezählt und das Verhältnis der insgesamt pro Weibchen abgelegten Eier auf mit Pilz bewachsenem und unbewachsenem Substrat berechnet.

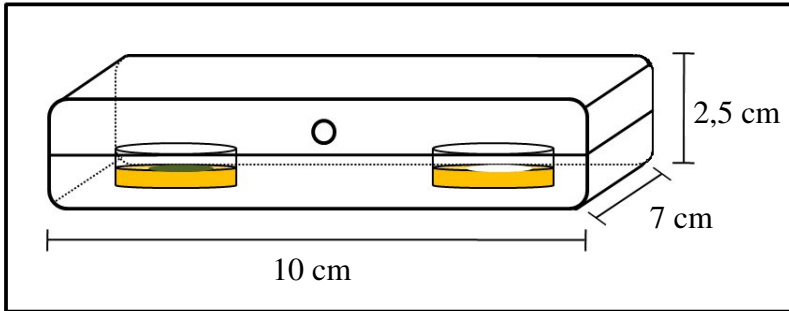


Abb. 5-1 Wahlarena Eiablage

Die Wahlarenen zur Eiablage bestanden aus einem durchsichtigen Kunststoffbehälter in dem sich zwei Substrat-Patches (Petrischalen mit 35 mm Ø) befanden. Ein Patch ist mit einer Pilzkolonie angeimpft, der Kontroll-Patch ist partiell mit Filterpapier abgedeckt.

Box 5-1 Experimenteller Aufbau zum Eiablageverhalten von <i>Drosophila melanogaster</i>	
Pilzarten	<i>A. nidulans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i>
Linie	WT
Entwicklungsvorsprung [d]	3; Kontrolle
Anzahl Fliegen ♀ pro Einheit	1
Replikate	20

Überleben von *D. melanogaster*-Larven in der Konfrontation mit *Aspergillus* ssp.

Die Konfrontation zur Ermittlung des Einflusses der Schimmelpilze auf das Überleben der *D. melanogaster*-Larven bis zum Adultstadium wurde in 2 mL Reaktionsgefäßen durchgeführt. Diese waren mit 1 ml DZM befüllt und wurden jeweils mit 1000 Konidien von *A. nidulans*, *A. fumigatus* bzw. *A. flavus* 1-4 Tage vor (1, 2, 3 und 4), am selben Tag wie (0) bzw. 1-2 Tage nach (-1, -2) dem Larventransfer inokuliert und bei 25°C und einem Tag/Nachtrhythmus von 14/10 Stunden inkubiert. Zu den Kontrollen (K) wurde je 1 µL NaCl-Lösung ohne Konidien gegeben. Es wurde die Anzahl von 1, 5 bzw. 10 Larven (L1, steril) pro experimenteller Einheit transferiert (Zusammenfassung siehe Box 5-2). Die Anzahl der geschlüpften Fliegen wurde täglich zur selben Zeit kontrolliert und geschlüpfte Fliegen aus dem Reaktionsgefäß entfernt.

Box 5-2 Versuchsaufbau zum Überleben von <i>D. melanogaster</i>-Larven bis zum Adultstadium konfrontiert mit <i>Aspergillus</i> ssp. Wildtyp	
Pilzarten	<i>A. nidulans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i>
Linie	WT
Entwicklungsvorsprung [d]	-2, -1, 0, 1, 2, 3 und 4; Kontrolle
Anzahl Larven pro Einheit	1, 5 und 10
Replikate	20

5.2. Konfrontation mit *Aspergillus* WT – Ergebnisse

Eiablageverhalten von *D. melanogaster*

Die den Fliegen zur Wahl gestellten durch Pilz okkupierten und pilzf freien Substratpatches wurden von den *D. melanogaster* Weibchen etwa zu gleichen Anteilen mit Eiern belegt (Abb. 5-2). Signifikante Unterschiede hinsichtlich der Wahl zwischen pilzbewachsenem und pilzf reiem Substrat gab es bei keiner der *Aspergillus* Arten (p-Werte siehe Abbildung 5-2). Auch hatte die Identität des Pilzes keinen Einfluss auf die Anzahl der insgesamt pro Weibchen gelegten Eier.

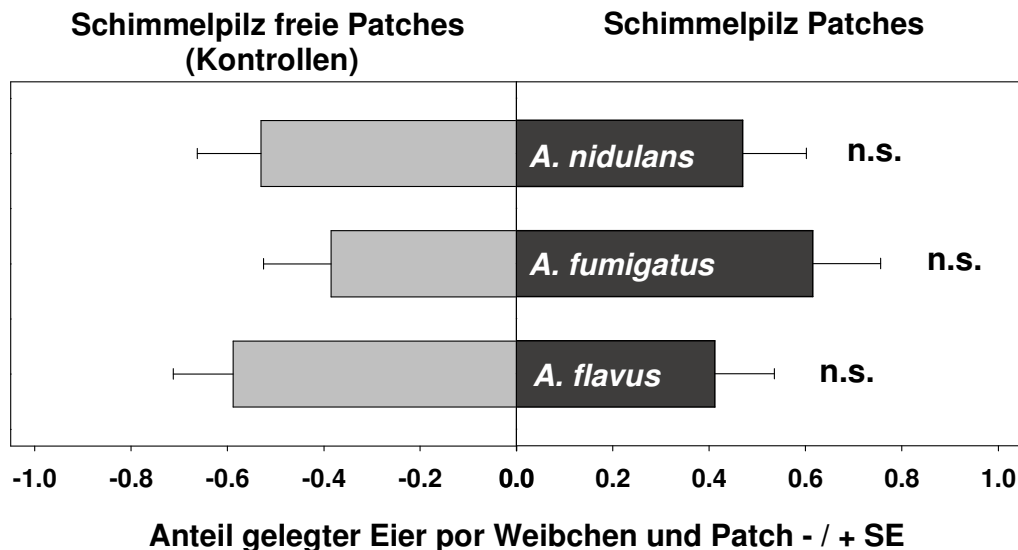


Abb. 5-2 Eiablageverhalten von *D. melanogaster*

Anteil der pro Weibchen gelegten Eier auf pilzf reiem bzw. pilzbewachsenem (*A. nidulans*, *A. fumigatus* und *A. flavus* WT) Substrat; n = 20; t-Test gepaarter Stichproben, arcsin transformierte Daten: *A. nidulans*, t = 1.059, d.f. = 18, p = 0,304; *A. fumigatus*, t = -0.987, d.f. = 20, p = 0,336; *A. flavus*, t = 0.373, d.f. = 19, p = 0,713; Einfluss des Pilzes auf die Anzahl insgesamt pro Weibchen gelegter Eier: einfaktorielle ANOVA: $F_{2,57} = 0.278$, p = 0,759

Überleben von *D. melanogaster*-Larven in der Konfrontation mit *Aspergillus* ssp.

Aspergillus nidulans

Einzelne mit *A. nidulans* Kolonien konfrontierte Fliegenlarven (eine Larve pro experimentelle Einheit) zeigten ohne Entwicklungsvorsprung des Pilzes (-2, -1 bzw. 0) eine leichte Reduktion in der Überlebenswahrscheinlichkeit (Abb. 5-3). Bei einem Entwicklungsvorsprung von einem und zwei Tagen reduzierte sich der Anteil überlebender Larven um 0,72 im Vergleich zur Kontrolle. Drei Tage Entwicklungsvorsprung des Pilzes führten zu einer Reduktion um 0,90 und vier Tage Vorsprung schließlich zu einer 100%igen Mortalität (Abb. 5-3).

Die Entwicklungszeit der Larven vom Ei bis zum Adultstadium stieg bei gesteigertem Entwicklungsvorsprung des Pilzes stetig an: Von 11,00 Tagen bei der Kontrolle auf 16,00 Tage bei einem Entwicklungsvorsprung von 3 Tagen. (Abb. 5-3).

Bei einer Larvendichte von 5 zeigte die Kontrolle eine ungewöhnlich hohe Mortalität (Abb. 5-3). Die spätere Inokulation von *A. nidulans* (-2 und -1) resultierte in einem reduzierten Anteil überlebender Larven. Bei gleichzeitiger Übertragung von Konidien und Larven (0) sowie bei einem Tag Vorsprung überlebten hingegen mehr Larven. Ab einem Entwicklungsvorsprung des

Pilzes von zwei Tagen (2, 3, 4) sank der Anteil überlebender Larven auf einen Anteil von 0,32 (zwei Tage). Bei drei Tagen Entwicklungsvorsprung gelang es keiner der Larven sich zur adulten Fliege zu entwickeln (Abb. 5-3).

Ebenso wie bei der Larvendichte von 1 stieg bei 5 Larven pro experimentelle Einheit die Entwicklungszeit mit dem Entwicklungsvorsprung des Pilzes an (Abb. 5-3).

Die Überlebenswahrscheinlichkeiten bei einer Larvendichte von 10 waren zwischen der Kontrolle und -2 bis 1 Tag Entwicklungsvorsprung des Pilzes relativ einheitlich (Abb. 5-3). Übereinstimmend mit den Verläufen der anderen Larvendichten reduzierte sich der Anteil überlebender Larven ab einem Entwicklungsvorsprung des Pilzes von zwei Tagen deutlich, hier auf einen Anteil von 0,32. Bei drei und vier Tagen Vorsprung reduzierte sich das Überleben der Larven ein weiteres Mal (Abb. 5-3).

Der Anstieg der Entwicklungszeit der Larven verlief auch bei der Larvendichte von 10 kontinuierlich mit steigendem Entwicklungsvorsprung des Pilzes (Abb. 5-3).

In der Konfrontation mit *A. nidulans* WT hatte das Alter (Entwicklungsvorsprung) des Pilzes sowohl auf das Überleben als auch auf die Entwicklungszeit der Larven einen signifikanten Einfluss (Tab. 4-1). Außerdem hatte die Larvendichte einen höchst signifikanten Einfluss auf die Entwicklungszeit der Larven (steigend bei steigender Dichte) in der Konfrontation mit dem Schimmelpilz (Tab. 4-1). Eine Erhöhung der Larvendichte in den pilzf freien Kontrollen hatte hingegen keinen Einfluss auf die Entwicklungszeit ($F_{1,49} = 0,34$; $p = 0,5624$). Höhere Terme des Alters waren ebenso höchst signifikant (vgl. Tab. 4-1), was einen nicht-linearen Zusammenhang der Fitnessparameter mit dem Entwicklungsvorsprung des Pilzes anzeigt.

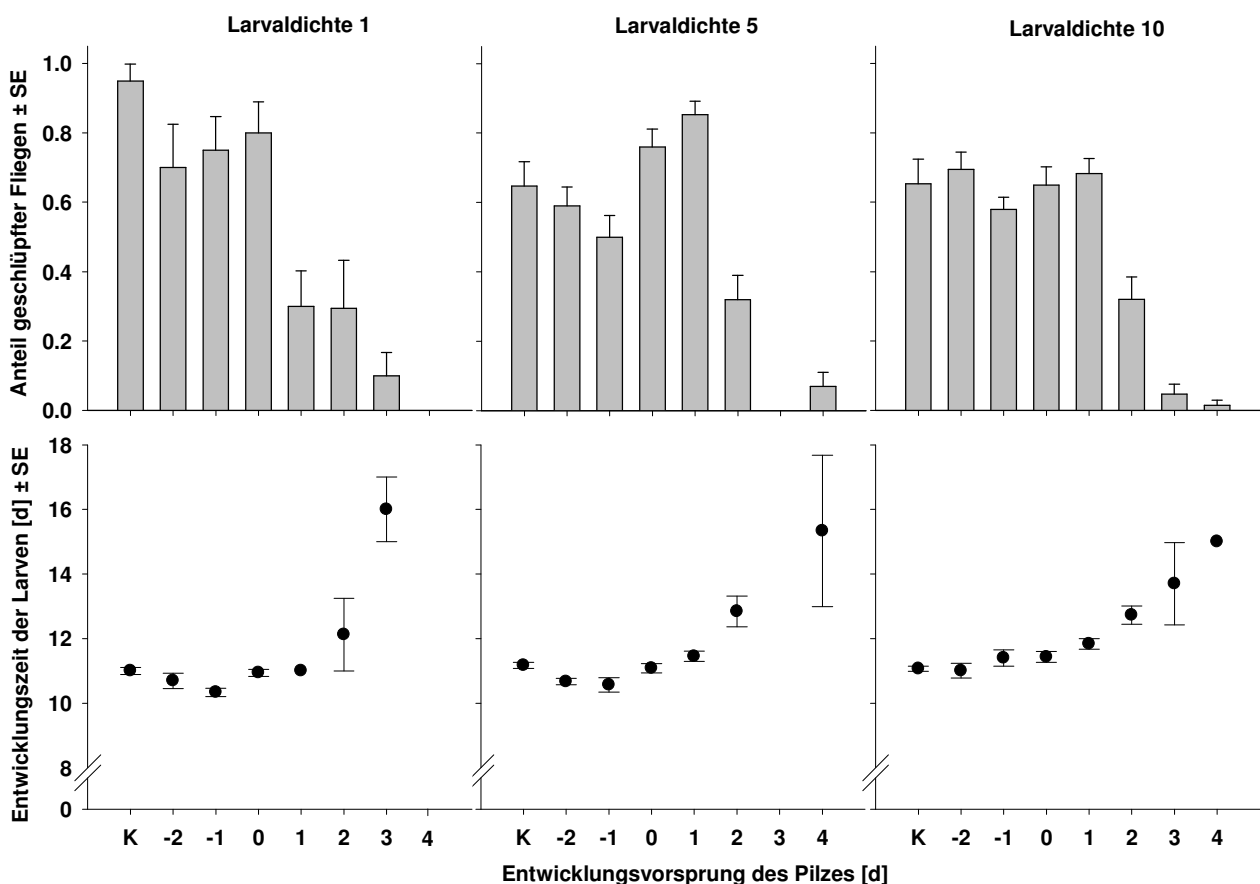


Abb. 5-3 Überleben und Entwicklungszeit bis zum Adultstadium von *D. melanogaster*-Larven konfrontiert mit *A. nidulans* WT Kolonien

Dargestellt ist der Anteil der sich bis zum Adultstadium entwickelten Larven bzw. deren Entwicklungszeit abhängig vom Entwicklungsvorsprung des Pilzes + bzw. ± SE. Der Standardfehler ist in den Diagrammen der Entwicklungszeit aufgrund extrem geringer Variation z.T. nicht/schlecht erkennbar; $n = 20$

Aspergillus fumigatus

Die Überlebenswahrscheinlichkeit der Larven konfrontiert mit *A. fumigatus* WT nahm bei einer Larvendichte von 1 stufenweise mit zunehmendem Alter (Entwicklungsvorsprung) des Pilzes ab (Abb. 5-4). Während sich die Larven in den Kontrollen bis zu 100% zum Adultstadium entwickeln konnten, reduzierte sich der Anteil überlebender Larven in den Pilzkonfrontationen auf 0,90 (-2 Tage) bis 0,75 (0 Tage). Bei einem Entwicklungsvorsprung von einem Tag reduzierte sich die Anzahl überlebender Larven drastisch auf einen Anteil von 0,05 (Abb. 5-4). Bei höheren Vorsprüngen war keine der Larven in der Lage sich bis zur Fliege zu entwickeln.

Wie schon bei der Konfrontation mit *A. nidulans* zu beobachten war, stieg auch hier die Entwicklungszeit mit steigendem Entwicklungsvorsprung des Pilzes an. Die Larven aus den Kontrollansätzen schlüpften im Mittel 10,90 Tage nach der Eiablage (Abb. 5-4). Die Entwicklungszeit verlängerte sich leicht bei Ansätzen in denen der Pilz keinen Entwicklungsvorsprung hatte auf im Mittel 13,00 Tage bei einem Vorsprung von einem Tag (Abb. 5-4).

Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei einer Larvendichte von 5 erhalten. Die nicht konfrontierten Larven überlebten mit einem leicht reduzierten Anteil (Abb. 5-4). Im Verlauf des gesteigerten Entwicklungsvorsprungs des Schimmelpilzes sanken die Mittelwerte überlebender Larven von 0,80 (-2) auf 0,66 (0). Bei einem Vorsprung von einem Tag reduzierte sich die Anzahl geschlüpfter Fliegen erneut (Abb. 5-4).

Die Entwicklungszeit erhöhte sich auch hier, jedoch im Vergleich zu den anderen Ergebnissen in geringerem Maße, von 11,03 Tagen (Kontrolle) auf 12,33 Tage (1 Tag) (Abb. 5-4).

Bei einer Larvendichte von 10 überlebte ein Anteil von 0,90, wenn die Inokulation mit Konidien mit zweitägiger Verzögerung erfolgte (-2) (Abb. 5-4). Etwa die Hälfte der Larven konnte sich bei einer um einen Tag (-1) verzögerten und bei gleichzeitiger Inokulation (0) entwickeln. Bei Entwicklungsvorsprüngen von *A. fumigatus* überlebten nur wenige bzw. keine Larven die Konfrontation (Abb. 5-4).

Die Entwicklungszeit stieg hier von 11,12 Tagen (Kontrolle) auf 12,25 Tage (1) leicht mit zunehmendem Alter des Schimmelpilzes an (Abb.5-4).

Die statistische Auswertung ergab für das Überleben der mit *A. fumigatus* konfrontierten Larven einen höchst signifikanten Effekt der Interaktionen des Alters mit dem Alter, des Alters mit der Dichte und höheren Interaktionen (vgl. Tab. 5-1). Alter und Dichte hatten global keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben der Larven. Die Entwicklungszeit wurde höchst signifikant global vom Alter und von Interaktionen des Alters mit dem Alter beeinflusst (Tab. 5-1).

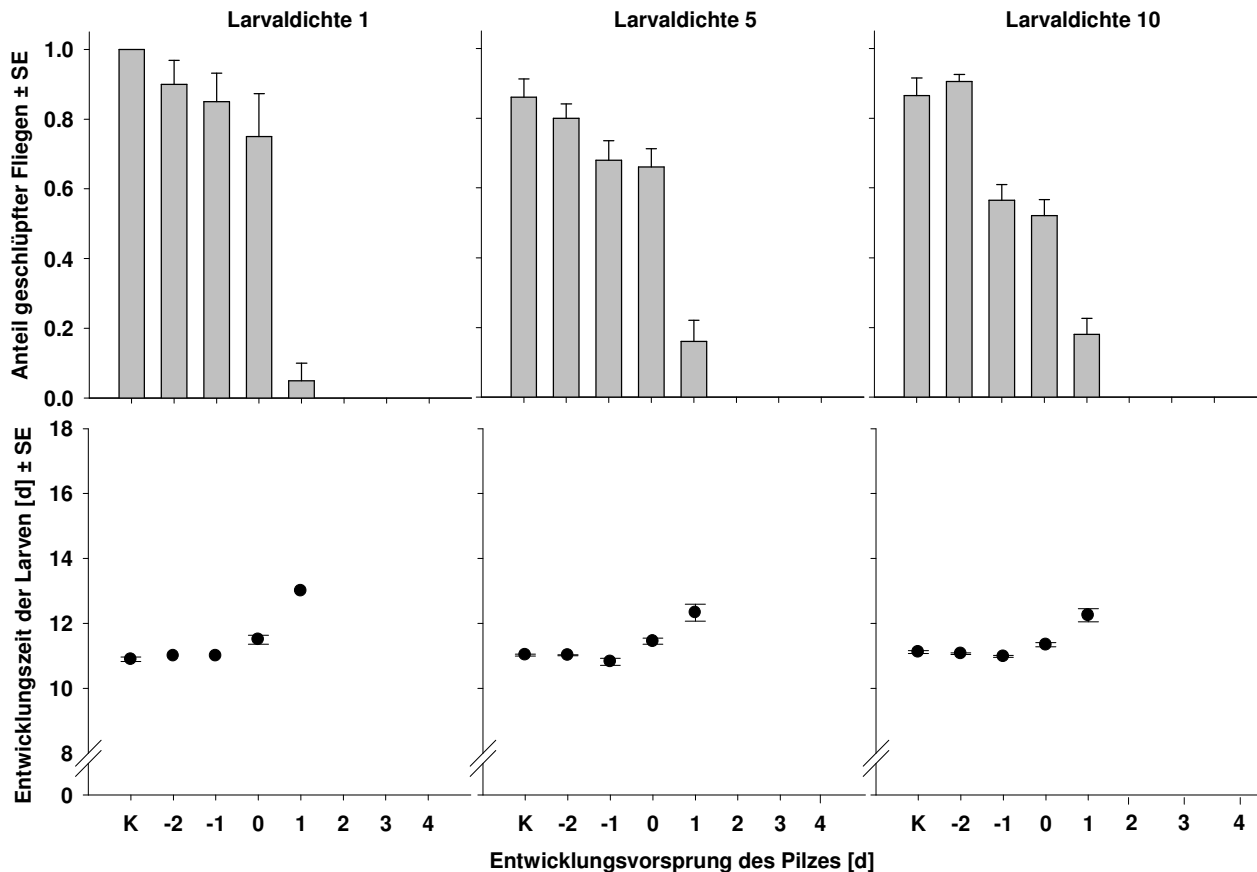


Abb. 5-4 Überleben von *D. melanogaster*-Larven bis zum Adultstadium und Entwicklungszeit konfrontiert mit *A. fumigatus* WT Kolonien

Anteil der sich bis zum Adultstadium entwickelten Larven bzw. deren Entwicklungszeit abhängig vom Entwicklungsvorsprung des Pilzes + bzw. ± SE. Der Standardfehler ist in den Diagrammen der Entwicklungszeit aufgrund extrem geringer Variation z.T. nicht/schlecht erkennbar; n = 20

Aspergillus flavus

Die Konfrontation mit *A. flavus* WT führte in allen Behandlungen zu einer im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöhten Mortalität (Abb. 5-5). Hierbei ist nicht wie bei den anderen *Aspergillus* Arten eine annähernde Linearität mit zunehmendem Entwicklungsvorsprung des Pilzes zu beobachten. Die unterschiedlichen Behandlungen (Entwicklungsvorsprung) resultierten in zueinander deutlich variierenden Überlebenswahrscheinlichkeiten der Fliegenlarven. Bei einer Larvendichte von 1 reduzierte sich der Anteil an geschlüpften Fliegen in der Abfolge der Entwicklungsvorsprünge auf 0,30 (-2), 0,55 (-1), 0,20 (0) bzw. 0,15 (1). Bei höheren Entwicklungsvorsprüngen gab es keine Überlebenden.

Die Entwicklungszeit blieb hingegen konstant bei 11,00 Tagen für die Behandlungen der Kontrolle, -2 Tage, -1 Tag und 0 Tage Entwicklungsvorsprung (Abb. 5-5). Larven die mit einem Tag Vorsprung inokulierten Pilzen konfrontiert wurden, benötigten im Mittel 11,33 Tage von der Eiablage bis zum Adultstadium.

Ähnlich variierte das Überleben bei einer Larvendichte von 5. Die Larven überlebten bei verzögerter Inokulation mit einem Anteil von 0,60 (-2) bzw. 0,39 (-1) (Abb. 5-5). Ein Anteil von 0,63 der Larven überlebten wenn sie am selben Tag transferiert wurden wie die Konidien und 0,33 wenn sie mit Pilzkolonien konfrontiert wurden, die einen Tag vor dem Larventransfer inokuliert worden waren.

Die Entwicklungszeit wies hier eine etwas größere Varianz im Vergleich zur Larvendichte 1 auf (Abb. 5-5).

Wurden die Larven mit einer Dichte von 10 mit *A. flavus* WT konfrontiert, reduzierte sich ebenso das Überleben der Larven im Vergleich zu Kontrollansätzen (Abb. 5-5). Außer bei gleichzeitiger Inokulation (Anteil überlebender Larven 0,71) überlebten weniger als die Hälfte der Larven die Konfrontation.

Die Entwicklungszeit war auch hier ähnlich konstant wie bei den Larvendichten von 1 und 5 (Abb. 5-5). Die Entwicklungszeit lag zwischen 10,63 Tagen (-1) und 11,09 Tagen (1) (Abb. 5-5).

Das Alter der Pilzkolonien sowie die Anzahl der Larven (Larvendichte) hatten global einen höchst signifikanten Einfluss auf das Überleben der Larven (höheres Überleben bei größerer Larvendichte). Darüber hinaus war der Einfluss des Alters in höheren Interaktionen ebenfalls höchst signifikant (vgl. Tab. 5-1). Die Entwicklungszeit war höchst signifikant abhängig vom Alter der Pilzkolonien zum Zeitpunkt des Larventransfers (verlängerte Entwicklungszeit bei älteren Pilzkolonien) (Tab. 5-1). Desweiteren hatten das Alter in Interaktion mit der Larvendichte und höhere Terme des Alters mit der Dichte ebenfalls einen hoch signifikanten Einfluss auf die Entwicklungszeit der Larven (verkürzte Entwicklungszeit bei größerer Larvendichte) (Tab. 5-1).

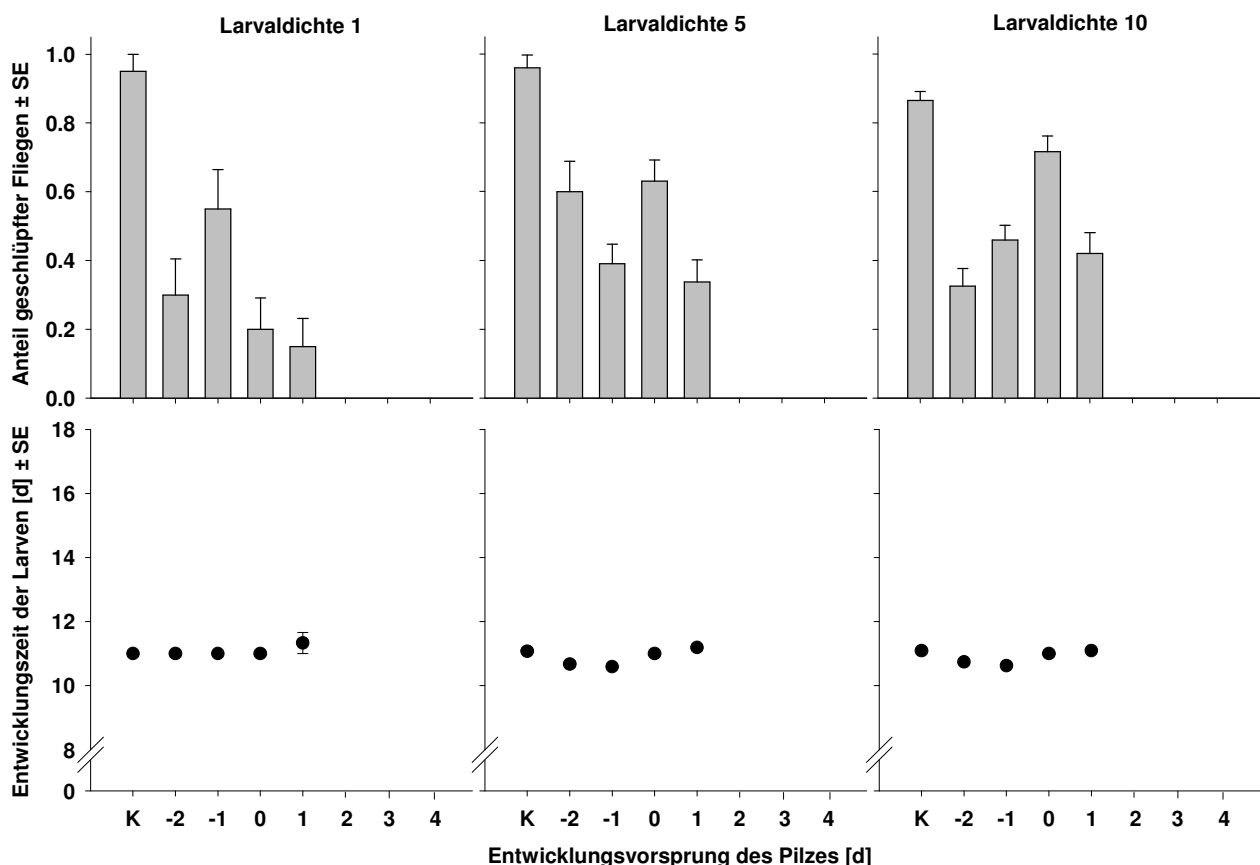


Abb. 5-5 Überleben von *D. melanogaster*-Larven bis zum Adultstadium und Entwicklungszeit von *Drosophila* konfrontiert mit *A. flavus* WT

Anteil der sich bis zum Adultstadium entwickelten Larven bzw. deren Entwicklungszeit abhängig vom Entwicklungsvorsprung des Pilzes + bzw. ± SE. Der Standardfehler ist in den Diagrammen der Entwicklungszeit aufgrund extrem geringer Variation z.T. nicht/schlecht erkennbar; n = 20

Tab. 5-1 Statistik zum Überleben und zur Entwicklungszeit der *D. melanogaster*-Larven bis zum Adultstadium konfrontiert mit *Aspergillus* ssp. WT SAS 9.1 GENMOD, durch reverse Eliminierung nichtsignifikanter Werte

	Überleben			Entwicklungszeit		
	<i>A. nidulans</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>
	F _{1,417}	F _{1,413}	F _{1,414}	F _{1,239}	F _{1,187}	F _{1,119}
Alter (Alt.)	25.85***	----	70.32***	----	32.86***	29.52***
Dichte	----	----	15.59***	20.11***	----	----
Alter x Alter	95.16***	40.53***	142.66***	80.47***	89.54***	----
Alter x Dichte	----	25.08***	----	----	----	14.23***
Alter x Alter x Alter	----	18.39***	200.99***	----	93.76***	----
Alter x Alter x Dichte	----	25.62***	----	7.09**	----	11.00**
Alter x Dichte x Dichte	----	----	----	----	----	9.70**
Alt. x Alt. x Alt. x Dichte	----	26.80***	----	----	----	----

p < 0,05 = *; p < 0,01 = **; p < 0,001 = ***

5.3. *D. melanogaster* in Konfrontation mit *Aspergillus* WT – Diskussion

Insekten und Schimmelpilze die sich saprotroph von organischem abgestorbenem Material ernähren, werden durch die gemeinsame Nutzung derselben Ressource miteinander konfrontiert. Hierbei kann von gegenseitiger Beeinflussung (zweiseitig negativer Interaktion – Konkurrenz) ausgegangen werden, da es sich bei verrottendem Material um eine zeitlich und räumlich limitierte Ressource handelt. Diese Konkurrenzsituation kann im Laufe der Evolution zur Herausbildung von Konkurrenz-Vermeidungsstrategien in Insekt und Schimmelpilz und zu Anpassungen und Gegenanpassungen geführt haben, die sich heute im Verhalten und im Ausgang einer Konfrontation widerspiegeln.

Für alle Individuen ist die Erkennung ihrer Umwelt wichtig um z.B. geeignete Nahrungsquellen aufzufinden, deren Qualität zu beurteilen, die Aufnahme von toxischen Substanzen zu vermeiden oder Sexualpartner zu finden. *D. melanogaster* verfügt über verschiedene olfaktorische und gustatorische Rezeptoren mit denen sie ihre Umwelt wahrnehmen kann. Olfaktorische Rezeptoren befinden sich z.B. an distalen Segmenten der Antennen und den Maxillarpalpen. Gustatorische Sensillen in Form von Borsten sind an verschiedenen Körperteilen wie z.B. am und im Proboscis, den Beinen oder dem Ovipositor verteilt (MONTELL 2009, SPEHR & MUNGER 2009). Volatile Stoffe perzipiert *D. melanogaster* hierbei überwiegend mit den Sensillen der Antennen, durch die sie in der Lage ist z.B. zwischen verschiedenen Hefearten zu diskriminieren (FOGLEMAN et al. 1981, 1982, DORSCH 2007).

Auch andere Pilze geben volatile Stoffe in einer derart charakteristischen Zusammensetzung ab, dass eine artspezifische Identifizierung der Pilze mittels dieser volatiler Stoffe möglich ist (SAHGAL et al. 2007, DRILLING & DETTNER 2009, WANG et al. 2009). Hierbei kann die Zusammensetzung und die Menge einzelner Bestandteile sogar Rückschlüsse auf die Identität toxischer und nicht toxischer Linien derselben Art zulassen, wie z.B. für *A. flavus* gezeigt wurde (JURJEVIC et al. 2008). Die Abgabe von volatilen Stoffe kann unvermeidbar durch Stoffwechsel bedingt Prozesse erfolgen, als eine Art Neben- oder Abfallprodukt der Synthese anderer essentieller Metabolite. Sie kann darüber hinaus jedoch auch eine Funktion ausüben, in dem die volatilen Stoffe z.B. das Wachstum benachbarter Kolonien unterdrücken (Allelopathie) (SINGH et al. 2009).

D. melanogaster nimmt in der Interaktion zwischen Schimmelpilzen und Insekten den mobileren Part ein, da sie sich aktiv und zielgerichtet fortbewegen kann. So könnte sie durch die Wahl ihrer Eiablagsubstrate ihren Nachkommen einen Vorteil dadurch verschaffen, dass sie konkurrenzärmere Substrate und Substrate die frei von toxischen Schimmelpilzen sind zur Eiablage bevorzugt. Ein derartiges Vermeidungsverhalten konnte jedoch nicht gezeigt werden. Dass die Fliegenweibchen nicht zwischen den angebotenen Substraten diskriminieren, kann an fehlenden Ausweichmöglichkeiten in der Natur liegen, da das Auskeimen der omnipräsenten Pilzsporen unvorhersehbar ist. Hierdurch könnte die Etablierung eines Vermeidungsverhaltens, welches einen potentiellen Fitnessvorteil darstellt, ausbleiben, und dementsprechend nicht an folgende Generationen weitergegeben werden. Der Effekt der möglichen Vermeidung durch die Weibchen könnte jedoch auch durch andere Mechanismen, wie z.B. gemeinschaftliche Unterdrückung des Pilzwachstums durch eine Aggregation der Larven, effektive Detoxifizierungs-Maßnahmen usw. die einen stärkeren Effekt auf die Fitness der Larven ausüben, überlagert werden, sodass keine Selektion zugunsten eines Vermeidungsverhaltens erfolgte. Denkbar ist, dass die Kosten eines Diskriminierungsverhaltens größer sind als der Nutzen eines sehr selektiven Eiablageverhaltens.

Das oben beschriebene fehlende Vermeidungsverhalten der Fliegenweibchen lässt sich nicht durch fehlenden Einfluss der Schimmelpilze auf die Entwicklung der Larven erklären. Abhängig von der Art des Schimmelpilzes und dessen Entwicklungsvorsprung führten alle verwendeten *Aspergillus* Arten zu einer z.T. sehr hohen Mortalität (bis zu 100%) unter den Larven. Die Arten bei denen eine größere Anzahl an Sekundärmetaboliten und Mykotoxinen bekannt ist (*A. fumigatus* und *A. flavus*), führten hierbei bei einem kürzeren Entwicklungsvorsprung zu einer höheren Mortalität als *A. nidulans*, die Art die weniger Sekundärmetaboliten synthetisiert (nach bisherigem Wissensstand). Unterschiedliche Toxizität der Mykotoxine (ROHLFS & OBMANN 2009) oder mögliche synergistische Effekte zwischen verschiedenen Sekundärmetaboliten könnten einen Anteil an der unterschiedlichen Mortalität haben (DOWD 1988, KLICH 2009).

Auch pathogene Wirkungen können mit dem in diesem Kapitel durchgeführten Experiment nicht ausgeschlossen werden, zumal *A. fumigatus* und *A. flavus* opportunistische Pathogene sind (Näheres hierzu siehe Kapitel 6).

Während die Fliegenweibchen weder eine Präferenz für pilzfreie noch für mit Schimmelpilz bewachsene Substrate zeigten, konnte ROHLFS in einer Untersuchung beobachten, dass die Larven von *D. melanogaster* ein stärkeres Aggregationsverhalten in der Anwesenheit von jungen Schimmelpilzen sowie eine Präferenz für die mit Schimmelpilz bewachsenen Substrate aufwiesen (ROHLFS 2005a). In größeren Gruppen sind die Larven effektiver in der Lage, das Pilzwachstum von Schimmelpilzen mit einem kurzen Entwicklungsvorsprung zu unterdrücken bzw. zu verzögern (WERTHEIM et al. 2002, ROHLFS 2005b, ROHLFS et al. 2005), was die negativen Auswirkungen des Schimmelpilzes auf die Fliegenlarven reduzieren kann. Eine erhöhte Anzahl an Larven führte in der Konfrontation mit *A. flavus* zu einer erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit. Bei *A. fumigatus* war diese abhängig vom Entwicklungsvorsprung des Pilzes. In diesem Ergebnis zeigt sich, dass durch hier unbekannte Mechanismen der negative Effekt den Schimmelpilze auf das Überleben der Larven ausüben, durch eine ausreichende Larvendichte reduziert werden kann. (Weiteres zu den Auswirkungen der Fliegenlarven auf das Wachstum der Pilze siehe Kapitel 6).

Mit zunehmendem Entwicklungsvorsprung der Pilze erhöhte sich die Zeit, die die Larven zur Entwicklung bis zur adulten Fliege benötigten. Bei *A. fumigatus* war dieses unabhängig von der Larvendichte. Eine erhöhte Entwicklungsdauer führt zu einer Reduktion der Fitness der Fliegen, zumal sie abhängig von saisonal auftretenden Ressourcen sind. Insbesondere hier bedeutet dies

eine Reduktion der weiteren Nachkommen folgender Generationen, da *D. melanogaster* gewöhnlich mehrere Generationen (Generationszeit ca. 14 Tage) innerhalb eines Jahres produziert.

In Anwesenheit des Pilzes führte eine höhere Larvendichte bei Konfrontation mit *A. nidulans*, zu einer verlängerten Entwicklungszeit. Hier führte die Anwesenheit des Schimmelpilzes vermutlich zu einer Intensivierung der intraspezifischen Konkurrenz unter den Larven, sodass die Entwicklungszeit der Larven verlängert wurde und die Fliegen die bereits bzgl. des Pilzvorsprungs aufgeführten Fittesseinbußen erfuhren. Die Erhöhung der Larvendichte in Abwesenheit des Pilzes führte indes nicht zu einer verlängerten Entwicklungszeit, womit sich das beobachtete Phänomen nicht allein durch ein erhöhtes Gedränge der Larven erklären lässt. Auch wurde das Überleben der Larven in Anwesenheit des Pilzes nicht von der Larvendichte beeinflusst.

Bei *A. flavus* hingegen wirkt sich die steigende Gruppengröße der Larven auf das Überleben von *D. melanogaster* positiv aus, als auch verkürzend auf die Entwicklungszeit der Larven (abhängig vom Entwicklungsvorsprung des Pilzes). Eine gesteigerte Larvenanzahl reduzierte somit zum einen den letalen Effekt des Schimmelpilzes auf die gesamte Gruppe der Larven, sodass auch jene Larven die Konfrontation überlebten, die eine geringere Widerstandsfähigkeit gegenüber dem Pilz aufwiesen. Hier kann daher von Auswirkungen eines Allee-Effekts gesprochen werden, bei dem trotz erhöhter intraspezifischer Konkurrenz ein Fitnessvorteil erhalten wird. Die reduzierte Entwicklungszeit zum anderen könnte durch einen reduzierten negativen Effekt des Schimmelpilzes auf die Larven ermöglicht werden. Diese muss jedoch nicht unbedingt mit einer gesteigerten Fitness einhergehen, da u.U. die Larven die Nahrungsaufnahme frühzeitig einstellen um das Substrat zu verlassen. Hierbei können sich durch eine verringerte Körpergröße im Adultstadium spätere Fittesseinbußen ausprägen.

Die unterschiedlichen verwendeten Schimmelpilze weisen einen ähnlichen Habitus auf, zeigen jedoch eine unterschiedliche Zusammensetzung und Vielfalt in den produzierten Sekundärmetaboliten (vgl. <http://www.aspergillus.org.uk>; Stand Jan 2010). Die Anwesenheit dieser Schimmelpilze führte zu einer unterschiedlichen Mortalität der Fliegenlarven. Ob die Sekundärmetabolite die entscheidende Schlüsselrolle bezüglich des Einflusses der Pilze auf die Mortalität der Larven einnehmen, bleibt hier jedoch offen. Der Einsatz von Sekundärmetabolit-defizienten Pilzmutanten im folgenden Kapitel (6.), soll genauere Erkenntnis über die Funktion der Mykotoxine liefern.

6. Sekundärmetabolit-defiziente Schimmelpilzmutanten ($\Delta laeA$)

LaeA (*loss of aflR expression*) ist ein globaler Gentranskriptions-Regulator der 2004 entschlüsselt wurde (BOK & KELLER 2004). Untersuchungen mit Deletionsmutanten zeigten, dass ausschließlich Gene des Sekundärmetabolismus unter dem Einfluss von LaeA stehen. Gene des Primärmetabolismus sind nicht betroffen, es sei denn, sie wurden in die durch LaeA regulierten Genabschnitte inseriert. In verschiedenen *Aspergillus* Arten wurden mehrere Gene gleichzeitig durch die Deletion von *laeA* beeinflusst, was zur Annahme führte, dass es sich bei LaeA um einen in Aspergillen konservierten globalen Regulator des Sekundärmetabolismus handelt (BOK et al. 2006b). Eine Besonderheit der Gene des Sekundärmetabolismus ist, dass sie in Clustern organisiert sind. Zusätzlich sind sie in der Gattung der Aspergilli häufig in subtelomeren Bereichen des Genoms lokalisiert (KELLER & HOHN 1997).

Sequenzanalysen von LaeA zeigten Übereinstimmungen mit Methyltransferasen, wenn auch Unterschiede zu bekannten Histon-Methyltransferasen vorhanden sind. Zusammen mit den Beobachtungen der Genexpression in Deletionsmutanten führte dies zu einer vermuteten Funktion von LaeA als Methyltransferase, die das Chromatin strukturell umformt und so die sich dort befindenden Gene auf epigenetischer Ebene der Expression zugänglich macht (KELLER et al. 2006).

LaeA reguliert Gene verschiedener Sekundärmetabolite. Unter anderem führt die Deletion von *laeA* in *A. nidulans* zu Pilzkolonien, die Sterigmatocystin und Penicillin nur in reduziertem Maße produzieren. In *A. fumigatus* unterliegt die Gliotoxin-Synthese der Regulation von LaeA. Desweiteren wurde die Virulenz, hier gemessen anhand der Anzahl an Kolonien, die sich in der Lunge von Mäusen erfolgreich ansiedeln konnten, in $\Delta laeA$ -Linien von *A. fumigatus* reduziert (BOK et al. 2005). Die Phagozytose von $\Delta laeA$ -Konidien durch Makrophagen war im Vergleich zum Wildtyp erhöht und Extrakte aus den Hyphen der Defizitmutanten töteten neutrophile Granulozyten in einem geringeren Maße ab (KELLER et al. 2006). In *A. flavus* ist u.a. die Synthese von Aflatoxin durch LaeA reguliert. Wenn auch nicht der gesamte Sekundärmetabolismus durch LaeA reguliert wird, so lässt sich dennoch sagen, dass zumindest Teile durch Deletion von *laeA* herunter reguliert werden.

6.1. Beeinflussung der *Drosophila*-Fitness durch die Defizitmutanten $\Delta laeA$

Die Fragestellung die auf der Verwendung von Sekundärmetabolit-Defizitmutanten beruht, liegt in der Annahme, dass die Mykotoxine eine entscheidende Schlüsselfunktion in der Interaktion zwischen Insektenlarven wie *D. melanogaster* und antagonistischen Schimmelpilzen der Gattung *Aspergillus* einnehmen. Zu erwarten ist eine gesteigerte Fitness der Fliegenlarven, bei Konfrontation mit einer Defizitmutante, die im Vergleich zu den Wildtypen eine in der Vielfalt und/oder in der Quantität reduzierte Mykotoxin-Synthese aufweist.

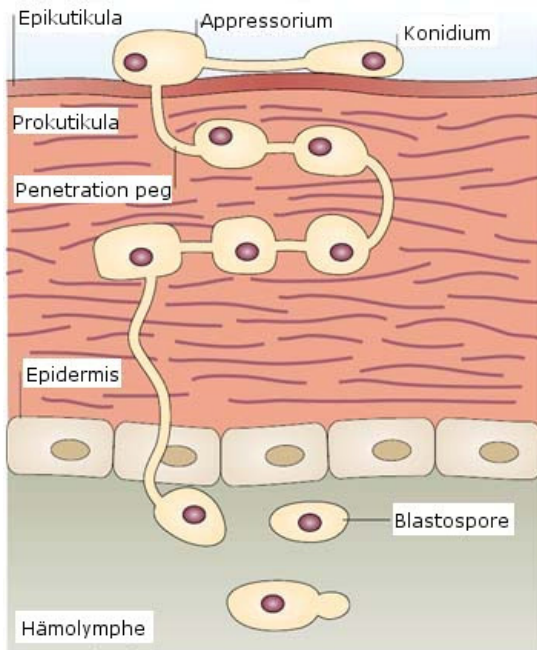
Um eine möglicherweise durch Entomopathogenität der Pilze hervorgerufene gesteigerte Mortalität der Larven auszuschließen, wurde überprüft, ob sich *D. melanogaster*-Larven durch sich im Medium befindliche Konidien infizieren lassen. Desweiteren wurde untersucht, zu welchem Zeitpunkt der Entwicklung die Mortalität in den Insekten eintritt.

6.1.1. Sekundärmetabolit-Defizitmutante $\Delta laeA$ – Material und Methoden

Sind Funktionen als Entomopathogene vorhanden?

Entomopathogen wirkende Pilze wachsen durch die Kutikula in den Wirtsorganismus hinein und können sich ggf. über die Hämolymphe im gesamten Körper ausbreiten. Gegen diese Art der Infektion verteidigt sich das Immunsystem der Insekten mit zellulären und humoralen Antworten, wobei die zelluläre Antwort über Phagozytose oder Einkapselung vermittelt wird (GILLESPIE et al. 2000).

Der Prozess einer Infektion durch entomopathogene Pilze verläuft in mehreren aufeinander-



6-1 Verlauf einer Pilzinfektion bei Insekten

bearbeitet nach: THOMAS & READ 2007

folgenden Schritten (Abb. 6-1). Ein Konidium lagert sich zunächst an der Oberfläche des Organismus an einer zumeist unzugänglichen Stelle an, z.B. in einer Vertiefung an Segmentübergängen oder Gelenken der Kutikula. Die Kutikula selbst kann jedoch antifungale Substanzen enthalten, die die weitere Auskeimung verhindern (GILLESPIE et al. 2000). In einem zweiten Schritt bildet sich ein Appressorium das sich fest an die Kutikula anheftet. Dieses Appressorium bildet eine senkrecht zur Kutikula gerichtete Hyphe (*penetration peg*) die in einer Kombination aus mechanischer und enzymatischer Aktivität die Kutikula durchbohrt (THOMAS & READ 2007) und im weiteren Verlauf, einhergehend mit weiterer Ausbildung von Zellen, durch die Kutikula und die Epidermis des Organismus hindurch wächst. Hat die Hyphe die Hämolymphe erreicht, können sich Blastosporen bilden, die sich über die

Hämolymphe im gesamten Organismus verteilen und dort weitere Hyphen ausbilden.

Ob die Mortalität der Fliegenlarven während der Konfrontation mit den in dieser Arbeit verwendeten *Aspergillus* Arten durch eine parasitäre Lebensweise hervorgerufen wurde, sollte mittels der Konfrontation mit Konidien, jedoch ohne den Einfluss wachsender Schimmelpilzkolonien auf dem Fraßmedium, geklärt werden. In 2 mL Reaktionsgefäße wurde 1 mL DZM pipettiert und dampfsterilisiert. Insgesamt wurden 280 Reaktionsgefäße vorbereitet und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Unmittelbar vor dem Transfer von 10 sterilen L1 Larven pro Versuchseinheit wurden in 8 Reaktionsgefäße jeweils 1 Millionen Konidien von *A. nidulans* WT, *A. nidulans* $\Delta laeA$, *A. fumigatus* WT, *A. fumigatus* $\Delta laeA$, bzw. *A. flavus* WT und *A. flavus* $\Delta laeA$ homogen unter das Medium gemischt. Zu den Kontrollen wurde Konidien-freie NaCl-Lösung gegeben und diese ebenfalls untergemischt. Das Medium wurde kurz abzentrifugiert und anschließend wurden die Larven transferiert. Um einen Einfluss von wachsendem Pilz auf das Ergebnis des Experiments zu verhindern, wurden die Larven eines jeden Reaktionsgefäßes nach 24 Stunden mit einer NaCl-Lösung aus dem Medium herausgewaschen und in erneut frisch inokulierte bzw. Kontroll-Reaktionsgefäße überführt. Dieses wurde bis zur beginnenden Verpuppung viermal wiederholt. Im Anschluss wurde die Anzahl der Puppen und im weiteren Verlauf die Anzahl der geschlüpften Fliegen dokumentiert (Zusammenfassung siehe Box 6-1).

Box 6-1 Experimenteller Aufbau zur Entomopathogenität von *Aspergillus* ssp. in *D. melanogaster*-Larven

Pilzarten	<i>A. nidulans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i>
Linie	WT und $\Delta laeA$
Entwicklungsvorsprung [d]	0; Kontrolle
Anzahl Larven pro Einheit	10
Replikate	8

Verlauf der Mortalität von *D. melanogaster*

In den bisherigen Untersuchungen wurde als Maß für die Interaktion zwischen den Schimmelpilzen und *Drosophila* die Anzahl an geschlüpften Fliegen herangezogen. Zu welchem Zeitpunkt die Mortalität eintritt bleibt auf diese Weise jedoch ungeklärt. Um diese Lücke zu schließen, wurden *D. melanogaster*-Larven mit Kolonien von *Aspergillus* ssp. konfrontiert und die Anzahl der lebenden Larven in einer Zeitreihe dokumentiert. Hierbei wurden die Daten durch tägliches Zählen der Larven aus unabhängig replizierten Reaktionsgefäßen ermittelt. Es wurden jeweils 50 Reaktionsgefäße für *A. nidulans* WT und *A. nidulans* $\Delta laeA$, *A. fumigatus* WT und *A. fumigatus* $\Delta laeA$ bzw. *A. flavus* WT und *A. flavus* $\Delta laeA$ sowie 50 Kontrollen vorbereitet und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Konidien der *A. nidulans* Linien wurden 3 Tage, die der *A. fumigatus* 2 Tage und die der *A. flavus* Linien 1 Tag vor dem Larventransfer inokuliert und bei 25°C inkubiert (Zusammenfassung siehe Box 6-2). 24 Stunden nach dem Larventransfer wurde damit begonnen, täglich je Behandlung 10 zufällig ausgewählte Reaktionsgefäße aus dem Experiment zu entnehmen und die Anzahl der lebenden Larven durch Auswaschen zu bestimmen.

Box 6-2 Experimenteller Aufbau zum Verlauf der Larvenmortalität von *D. melanogaster* konfrontiert mit *Aspergillus* ssp. WT und $\Delta laeA$

Pilzarten	<i>A. nidulans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i>
Linie	WT und $\Delta laeA$
Entwicklungsvorsprung [d]	3 <i>A. nidulans</i> 2 <i>A. fumigatus</i> 1 <i>A. flavus</i> Kontrolle
Anzahl Larven pro Einheit	10
Replikate	10

Überleben von *D. melanogaster*-Larven bis zum Adultstadium

Die potenziell unterschiedlichen Einflüsse von *Aspergillus* Wildtyp und Sekundärmetabolit-Defizitmutanten wurden durch Konfrontation von *D. melanogaster* während des Larvenstadiums in 2 mL Reaktionsgefäßen durch Dokumentation des Entwicklungserfolgs der Larven ermittelt. Hierzu wurden 1000 Konidien des Wildtyps, der $\Delta laeA$ -Mutante sowie der entsprechenden komplementären Linien 1-3 Tage vor (1, 2 und 3) bzw. am selben Tag (0) des Larventransfers inokuliert und bei 25°C vorinkubiert. Zur Kontrolle wurde die entsprechende Menge an NaCl-Lösung gegeben. Je experimenteller Einheit wurden 10 sterile *D. melanogaster*-Larven des L1 Stadiums eingesetzt (Zusammenfassung siehe Box 6-3). Nach einer Entwicklungszeit von etwa

8 Tagen nach Larventransfer begannen die ersten Adulttiere zu schlüpfen. Dieser Schlupf wurde täglich zur selben Zeit kontrolliert und geschlüpfte Fliegen aus den Reaktionsgefäßen entfernt.

Um auszuschließen, dass die gentechnische Manipulation an sich, und nicht die Deletion von *laeA* im speziellen, in der Konfrontation mit *D. melanogaster*-Larven zu einem unterschiedlichen Überleben der Larven führt, wurden parallel für jede Schimmelpilzart Ansätze mit der entsprechenden komplementären Linie durchgeführt. In diesen Pilzlinien wurde nach Deletion von *laeA* dieses Gen wieder inseriert und so eine Expression der betroffenen Gene auf dem Niveau des Wildtyps erhalten (BOK & KELLER 2004).

Box 6-3 Experimenteller Aufbau zum Überleben von *D. melanogaster*-Larven bis zum Adultstadium konfrontiert mit *Aspergillus* ssp. Wildtyp, Sekundärmetabolit-Defizitmutanten sowie deren komplementären Linien

Pilzarten	<i>A. nidulans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i>
Linie	WT, $\Delta laeA$, komplementärer $\Delta laeA::laeA$
Entwicklungsvorsprung [d]	0, 1, 2 und 3; Kontrolle
Anzahl Larven pro Einheit	10
Replikate	20

Zur Untersuchung ob eine größere Anzahl von Larven einen Vorteil in der Entwicklung von *D. melanogaster* herbeiführt (Allee-Effekt, trotz erhöhter intraspezifischer Konkurrenz wird ein Fitnessvorteil erreicht), wurde das vorangegangene Experiment mit einer gesteigerten Anzahl von Larven wiederholt. Hierbei wurden 1, 10 bzw. 20 Larven je experimenteller Einheit eingesetzt. Desweiteren wurde der zeitliche Entwicklungsvorsprung der Pilze in dieser Untersuchung den Ergebnissen des vorangegangenen Experiments dahingehend angepasst, dass ein Entwicklungsvorsprung für jede Pilzart gewählt wurde, bei der in allen Linien eine Mortalität vorlag, die potenziell ein verringertes und zugleich ein erhöhtes Überleben der Larven bei verschiedenen Larvendichten ermöglichte. Hierbei ergab sich eine Inokulation der Konidien von *A. nidulans* 3 und 4 Tage, von *A. fumigatus* 2 und 3 Tage bzw. von *A. flavus* 1 und 2 Tage vor dem Larventransfer (Zusammenfassung siehe Box 6-4).

Box 6-4 Experimenteller Aufbau zum Überleben von *D. melanogaster*-Larven bis zum Adultstadium konfrontiert mit *Aspergillus* ssp. WT, Sekundärmetabolit-Defizitmutanten sowie deren komplementären Linien bei unterschiedlichen Larvendichten und varrierender Entwicklungsvorsprünge der Pilze

Pilzarten	<i>A. nidulans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i>
Linie	WT, $\Delta laeA$, komplementärer $\Delta laeA::laeA$
Entwicklungsvorsprung [d]	3 und 4 <i>A. nidulans</i> ; Kontrolle 2 und 3 <i>A. fumigatus</i> ; Kontrolle 1 und 2 <i>A. flavus</i> ; Kontrolle
Anzahl Larven pro Einheit	1, 10 und 20
Replikate	20

6.1.2. Sekundärmetabolit-Defizitmutante $\Delta laeA$ – Ergebnisse

Entomopathogenität als mögliche Ursache der Larvalmortalität

Die mit *Aspergillus* ssp. Konidien konfrontierten Larven zeigten keine signifikant erhöhte Mortalität zwischen den einzelnen Behandlungen inkl. der Kontrolle (Abb. 6-2). Der Anteil lebender Larven reduzierte sich insbesondere innerhalb der ersten 24 Stunden bei allen verwendeten Arten und Linien. An weiteren Beobachtungstagen sank der Anteil nur im geringen Maße weiter. Am vierten Tag des experimentellen Verlaufes lag der Anteil lebender Larven in einem Bereich zwischen 0,7125 (*A. fumigatus* $\Delta laeA$) und 0,8875 (*A. flavus* WT). Weder die Konfrontation mit den verschiedenen Pilzarten noch die Verwendung der Sekundärmetabolit-Defizitmutanten resultierte in signifikant verschiedenen Werten (zur Statistik siehe Abb. 6-2). Ebenso gab es keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Puppen oder der Anzahl der geschlüpften Fliegen (Abb. 6-2).

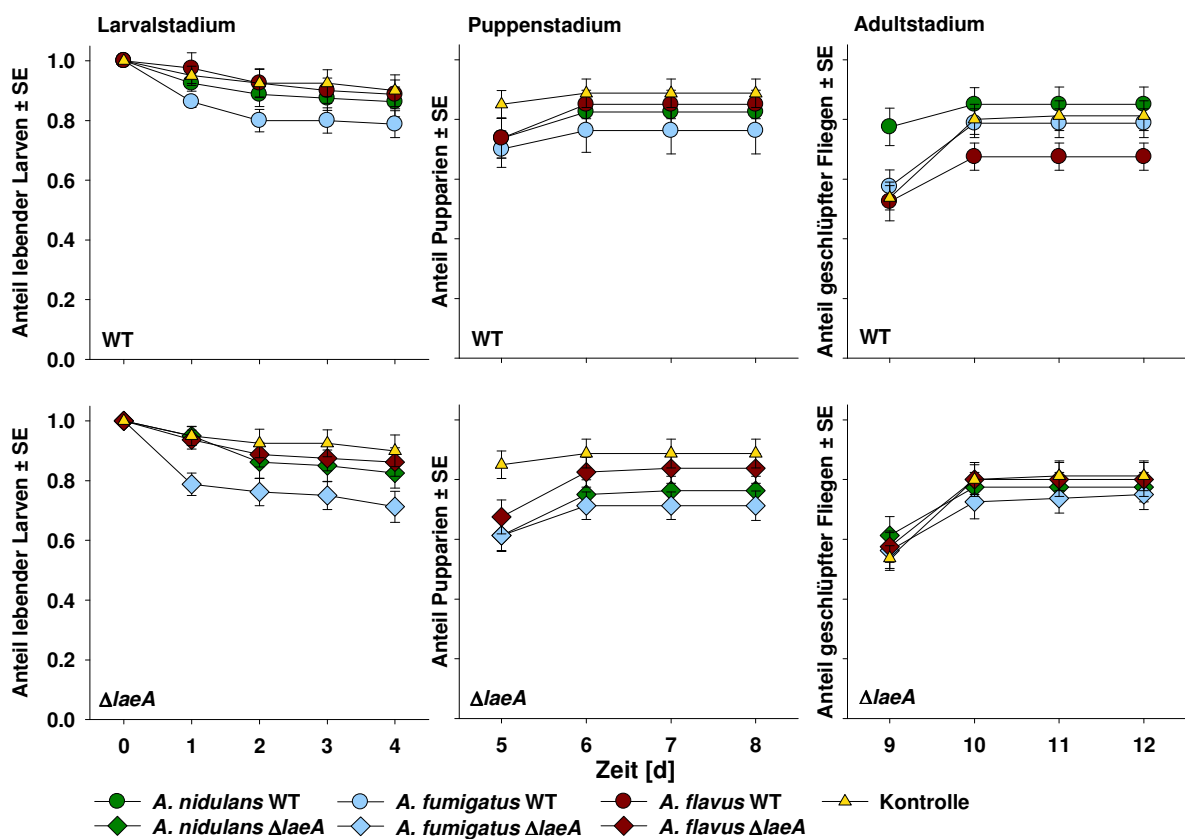


Abb. 6-2 Entomopathogenität von *Aspergillus* ssp. in *D. melanogaster*-Larven

Anteile der lebenden Individuen des Larval-, Puppen- bzw. Adultstadiums der mit Konidien von *A. nidulans*, *A. fumigatus* bzw. *A. flavus* WT und $\Delta laeA$ konfrontierten Larven abhängig von der Zeit; Unterschiede zwischen den Linien waren nicht signifikant (Zeitabhängige Mortalität, Cox Regression: Wald-Test, $\chi^2 = 0,5973$, d.f. = 1, $p = 0,4396$); $n = 8$

Verlauf der Mortalität von *D. melanogaster*

Durch die relativ geringe Größe der L1-Larven ist insbesondere für den ersten Tag der Zählung ein verhältnismäßig großer Fehler anzunehmen, was die in fast allen Behandlungen gemachte Beobachtung eines Anstiegs der Anzahl lebender Larven vom ersten zum zweiten Tag erklärt. Nach dem fünften Tag war nach dem Entwicklungsablauf von *D. melanogaster*-Larven bei 25°C mit einer Verpuppung der Larven zu rechnen, weshalb das Experiment nach diesem Tag beendet wurde.

Am zweiten Tag der Konfrontation mit *A. nidulans* WT Kolonien lag der Anteil der lebenden Larven bei etwa 0,55 (Abb. 6-3). Im weiteren Verlauf reduzierte sich der Anteil auf 0,21 (vierter Tag) bzw. 0,28 (fünfter Tag). Im Gegensatz dazu blieb der Anteil der Larven, die mit der Sekundärmetabolit-Defizitmutante $\Delta laeA$ von *A. nidulans* konfrontiert wurden, während des gesamten Beobachtungszeitraums relativ konstant zwischen 0,73 und 0,75 (Abb. 6-3), mit Ausnahme des letzten Tages der Beobachtung.

Durch die Konfrontation mit *A. fumigatus* WT reduzierte sich bereits am zweiten Tag der Anteil der noch lebenden Larven auf 0,15 (Abb. 6-3). Im weiteren Verlauf sank sie weiter ab bis zu einer 100%igen Mortalität. Bei *A. fumigatus* $\Delta laeA$ lebte am zweiten Tag noch ein Anteil von 0,69 und somit 54% mehr als beim Wildtyp, jedoch reduzierte sich auch hier im weiteren Verlauf die Anzahl lebender Larven drastisch auf einen Wert nahe 0 (Abb. 6-3).

Ebenso wie beim Wildtyp von *A. fumigatus* resultierte die Konfrontation mit dem Wildtyp von *A. flavus* bereits nach kurzer Zeit in einer erheblichen Mortalität (Abb. 6-3). Auch in der Konfrontation mit der *A. flavus* $\Delta laeA$ -Mutante reduzierte sich die Anzahl lebender Larven, hier zum fünften Tag auf einen Anteil von 0,11 (Abb. 6-3), jedoch verlief die Mortalität in einer weniger steilen Kurve.

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind in der Tabelle 6-1 zusammengefasst. Hier nach hat sowohl die Identität des Pilzes (Art) als auch die Mutation in der Sekundärmetaboliten-Produktion (Linie) global einen signifikanten Einfluss auf das Überleben der Larven. Verschiedene Interaktionen zwischen der Dauer der Konfrontation (Tag) und Pilzart bzw. Mutation hatten einen z.T. hoch bzw. höchst signifikanten Einfluss.

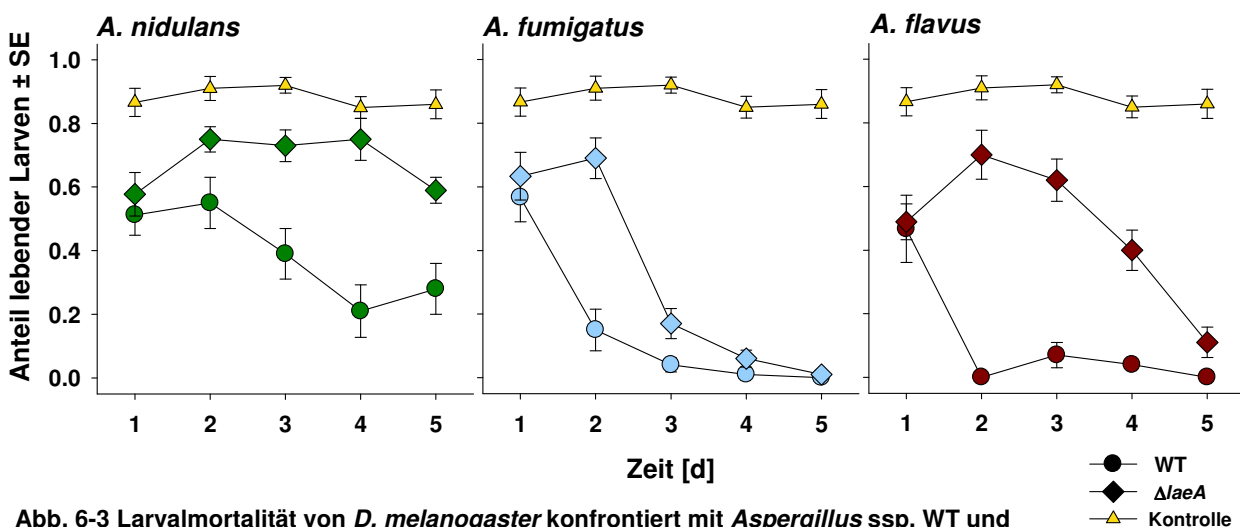


Abb. 6-3 Larvalmortalität von *D. melanogaster* konfrontiert mit *Aspergillus* spp. WT und $\Delta laeA$ -Mutanten

Anteil lebender Larven \pm SE abhängig von der Zeit (Tag des Auswaschens) konfrontiert mit WT bzw. $\Delta laeA$ -Mutanten Kolonien von *A. nidulans* mit 3 Tagen, *A. fumigatus* mit 2 Tagen bzw. *A. flavus* mit 1 Tag Entwicklungsvorsprung. Der Anteil lebender nicht konfrontierter Larven (Kontrolle) ist in allen drei Diagrammen dargestellt; n = 10

Tab. 6-1 Statistik zur Larvalmortalität von *D. melanogaster* konfrontiert mit *Aspergillus* ssp. WT und $\Delta laeA$ -Mutanten
SAS 9.1 GENMOD, durch reverse Eliminierung nichtsignifikanter Werte

	d.f.	F
Art	2,270	3.59*
Linie	1,270	4.81*
Tag x Art	2,270	5.55**
Tag x Linie	1,270	5.73*
Tag x Tag x Art	2,270	6.22**
Tag x Tag x Linie	1,270	6.65*
Tag x Art x Linie	2,270	90.26***
Tag x Tag x Tag x Art	2,270	6.81**
Tag x Tag x Tag x Linie	1,270	7.28**

$p < 0,05 = *$; $p < 0,01 = **$; $p < 0,001 = ***$

Entwicklungserfolg von *Drosophila melanogaster*-Larven bis zum Adultstadium

Das Überleben der Larven bis zum Adultstadium wurde mit Pilzkolonien von *A. nidulans*, *A. fumigatus* und *A. flavus*, den Wildtypen, der $\Delta laeA$ -Mutante und der komplementären Linie ($\Delta laeA::\Delta laeA$) durchgeführt. Hierbei wurden die Konidien 0-3 Tage vor dem Transfer der Larven inokuliert und die Anzahl der geschlüpften Fliegen dokumentiert.

Aspergillus nidulans

Bei der Konfrontation mit *A. nidulans* WT sowie dessen komplementärer Linie ($\Delta laeA::laeA$) reduzierte sich ab einem Entwicklungsvorsprung von 3 Tagen der Anteil der geschlüpften Fliegen drastisch um 56% in der Konfrontation mit dem Wildtyp bzw. 62% in der Konfrontation mit der komplementären Linie (Abb. 6-4). In der Kontrolle ohne Konfrontation überlebte ein Anteil von $0,79 \pm 0,03$ SE der Larven (Daten in der Abbildung nicht gezeigt). Die Werte bei einem Vorsprung von 2 und 3 Tagen lagen vergleichsweise nah an den Werten für 0 Tage Entwicklungsvorsprung (Abb. 6-4). Die Konfrontation mit der Sekundärmetaboliten-Defizitmutante von *A. nidulans* hingegen resultierte in Werten zwischen 0,70 und 0,75 für alle Entwicklungsvorsprünge (Abb. 6-4). Die statistische Auswertung (vgl. Tab. 6-2) zeigte, dass das Alter global und das Alter als Interaktion mit der Mutation (Linie) einen höchst signifikanten Einfluss auf das Überleben der Larven bis zum Adultstadium hatten.

Aspergillus fumigatus

Durch die Anwesenheit von *A. fumigatus* WT und der komplementären Linie ($\Delta laeA::laeA$) wurde die Überlebenswahrscheinlichkeit der Larven ab einem Entwicklungsvorsprung von 2 Tagen auf fast 0 reduziert (Abb. 6-4; Kontrolle: $0,85 \pm 0,02$ SE [nicht gezeigt]). Die *A. fumigatus* $\Delta laeA$ -Mutante führte bei einem entsprechenden Entwicklungsvorsprung von zwei Tagen zu einer weitaus geringeren Mortalität, sodass ca. 63% mehr Larven bis zum Adultstadium überlebten. Jedoch erhöhte sich die Mortalität ab einem Entwicklungsvorsprung von drei Tagen sprunghaft auf 100% (Abb. 6-4). Statistisch war die Interaktion zwischen Entwicklungsvorsprung und

Defizit-Mutation (Alter bzw. Linie) hoch signifikant und die höhere Interaktion zwischen Entwicklungsvorsprung und Mutation höchst signifikant (vgl. Tab. 6-2).

Aspergillus flavus

In der Konfrontation mit *A. flavus* lag die Mortalität weitaus höher als bei den beiden anderen verwendeten *Aspergillus* Arten. Keine der Larven die mit *A. flavus* WT konfrontiert wurde, war in der Lage, sich bis zum Adulttier zu entwickeln (Abb. 6-4). Die komplementäre Linie von *A. flavus* ($\Delta laeA::laeA$) führte bei null Tagen Entwicklungsvorsprung zu einem Anteil überlebender Larven von 0,01. Größere Zeitvorsprünge führten zu einer 100%igen Mortalität (Abb. 6-4). Bei der Sekundärmetabolit-Defizitmutante *A. flavus* $\Delta laeA$ überlebte bei null Tagen Entwicklungsvorsprung ein Anteil von 0,78 der Larven, reduzierte sich jedoch um 23% bei einem Tag Entwicklungsvorsprung des Pilzes (Abb. 6-4). Auch hier stieg die Mortalität sprunghaft an und resultierte bei einem Entwicklungsvorsprung von zwei bzw. drei Tagen in einem Anteil von 0 geschlüpfter Fliegen. Der Anteil überlebender Larven der Kontrollbehandlung lag bei $0,83 \pm 0,02$ SE (Daten in der Abb. 6-4 nicht gezeigt). Alter und Defizit-Mutation hatten einen statistisch höchst signifikanten Einfluss auf das Überleben (vgl. Tab. 6-2).

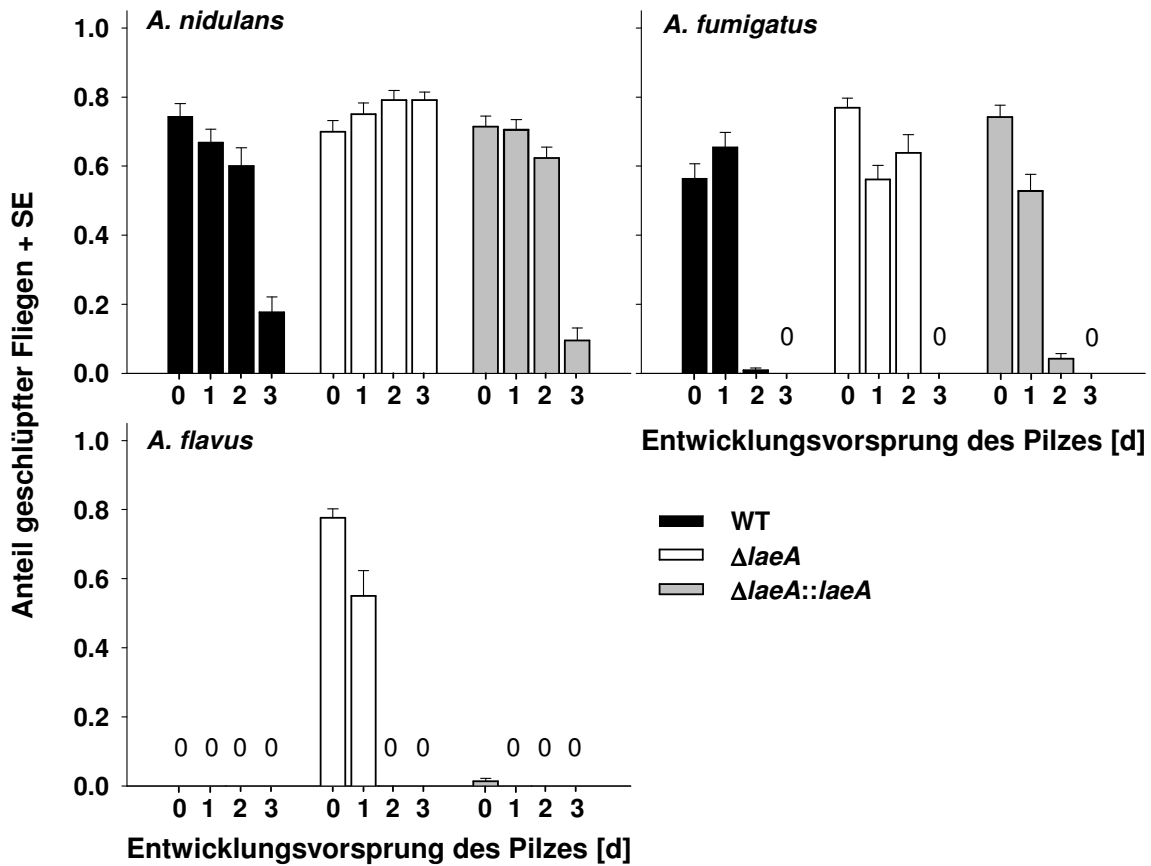


Abb. 6-4 Überleben von *D. melanogaster*-Larven bis zum Adultstadium konfrontiert mit *Aspergillus* ssp. WT, $\Delta laeA$ und $\Delta laeA::laeA$

Anteil geschlüpfter Fliegen + SE abhängig vom Entwicklungsvorsprung des Pilzes. Jeweils 10 Larven wurden mit Kolonien von *A. nidulans*, *A. fumigatus* bzw. *A. flavus* WT, $\Delta laeA$ -Mutante bzw. der komplementären Linie mit einem Entwicklungsvorsprung von 0 bis 3 Tagen konfrontiert; n = 20

Tab. 6-2 Statistik zum Überleben von *D. melanogaster*-Larven bis zum Adultstadium konfrontiert mit Sekundärmetabolit-Defizitmutanten der Gattung *Aspergillus* SAS 9.1 GENMOD, durch reverse Eliminierung nichtsignifikanter Werte

	<i>A. nidulans</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>
	F _{1,180}	F _{2,130}	F _{1,100}
Alter	21.44***	-----	16.66***
Linie	-----	-----	349.89***
Alter x Alter	32.76***	-----	-----
Alter x Linie	95.15***	5.41**	-----
Alter x Alter x Linie	-----	12.08***	-----

p < 0,05 = *; p < 0,01 = **; p < 0,001 = ***

Dichteabhängiger Entwicklungserfolg von *D. melanogaster*-Larven

Zur Überprüfung ob *D. melanogaster*-Larven in einer höheren Larvendichte weniger stark in ihrer Fitness durch die Anwesenheit der Pilze beeinträchtigt werden (Allee-Effekt), wurden jeweils 1, 10 und 20 sterile *D. melanogaster*-Larven mit *A. nidulans* Kolonien mit einem Entwicklungsvorsprung von 3 und 4 Tagen, mit *A. fumigatus* Kolonien mit einem Entwicklungsvorsprung von 2 und 3 Tagen und mit *A. flavus* Kolonien mit einem Entwicklungsvorsprung von 2 Tagen und 1 Tag konfrontiert und die Anzahl der geschlüpften Fliegen dokumentiert. Es kamen jeweils der Wildtyp, die Sekundärmetabolit-Defizitmutante $\Delta laeA$ und deren komplementäre Linie $\Delta laeA::laeA$ zum Einsatz.

Aspergillus nidulans

Die Konfrontation mit *A. nidulans* WT und der komplementären Linie führte bei allen Larvendichten zu einer deutlich gesteigerten Mortalität (Abb. 6-5). In den Kontrollansätzen überlebten die Larven mit einem Anteil von $0,93 \pm 0,05$ SE, $0,83 \pm 0,03$ SE bzw. $0,83 \pm 0,01$ SE bei einer Larvendichte von 1, 10 bzw. 20 Larven pro experimenteller Einheit (Daten in Abb. 6-5 nicht angegeben). Hingegen reduzierte sich der Anteil geschlüpfter Fliegen durch die Konfrontation mit dem Wildtyp von *A. nidulans* bei einem dreitägigen Entwicklungsvorsprung um 88% (Larvendichte 1), 64% (Larvendichte 10) bzw. 74% (Larvendichte 20) (Abb. 6-5), sowie bei der komplementären Linie um 78%, 69% bzw. 67% im Vergleich zur Kontrolle. Eine ähnlich reduzierte Überlebenswahrscheinlichkeit wurde für die Konfrontation bei vier Tagen Entwicklungsvorsprung des Wildtyps und der komplementären Linie von *A. nidulans* erhalten (Abb. 6-5). Die Sekundärmetabolit-Defizitmutante hingegen ermöglichte bei einem Entwicklungsvorsprung von drei Tagen einen Anteil überlebender Larven, der nahe dem der Kontrollen und somit weit über dem der Konfrontation mit dem Wildtyp oder der komplementären Linie lag (Abb. 6-5). Im Vergleich dazu war der Anteil überlebender Larven bei einem Entwicklungsvorsprung des Pilzes von vier Tagen leicht reduziert (Abb. 6-5). Für *A. nidulans* war der Einfluss des Alters der Pilze auf das Überleben der Larven hoch signifikant, der Defizit-Mutation höchst signifikant sowie die Larvendichte und die Interaktion zwischen Kolonialeter und Larvendichte signifikant (vgl. Tab. 6-3).

Aspergillus fumigatus

Auch beim Wildtyp und der komplementären Linie von *A. fumigatus* gab es eine im Vergleich zur $\Delta laeA$ -Mutante deutlich reduzierte Überlebenswahrscheinlichkeit (Abb. 6-5). Die Anteile überlebender Larven in der Konfrontation mit dem Wildtyp bei einem Entwicklungsvorsprung von zwei Tagen lagen bei 92%, 93% bzw. 91% (Larvendichte 1, 10 bzw. 20) unter denen der Kontrollansätze (Anteil $0,97 \pm 0,03$ SE, $0,96 \pm 0,01$ SE bzw. $0,91 \pm 0,02$ SE; Daten in Abb. 6-5 nicht gezeigt). In der Konfrontation mit der komplementären Linie konnten Fliegen nur bei einer Larvendichte von 10 schlüpfen (Abb. 6-5). Die Defizitmutante *A. fumigatus* $\Delta laeA$ ermöglichte im Gegensatz dazu ein im Vergleich zur Kontrolle um 95%, 81% bzw. 53% reduziertes und somit höheres Überleben der Larven als die Wildtyp bzw. komplementäre Linie (Abb. 6-5). Bei einem Entwicklungsvorsprung von drei Tagen überlebte keine der Larven bis zum Adultstadium unabhängig von der Larvendichte oder Pilz-Linie. Aus diesem Grund wurden die Daten nicht dargestellt und gingen nicht in die statistische Berechnung mit ein. Für *A. fumigatus* war die Interaktion zwischen dem Einfluss der Larvendichte und der Defizit-Mutation (Linie) höchst signifikant (vgl. Tab 6-3).

Aspergillus flavus

Ebenso wie bei *A. fumigatus* war bei *A. flavus* WT und $\Delta laeA::laeA$ nahezu keine Larve in der Lage zu überleben (Abb. 6-4). Im Vergleich dazu lag der Anteil überlebender Larven die mit der Sekundärmetabolit-Defizitmutante konfrontiert wurden um 5%, 62% bzw. 8,7% höher als in der Konfrontation mit dem Wildtyp (Larvendichte 1, 10 bzw. 20). Die in der Abb. 6-4 nicht dargestellten Anteile überlebender Larven der Kontrollansätze lagen bei $0,90 \pm 0,07$ SE, $0,88 \pm 0,04$ SE, bzw. $0,87 \pm 0,02$ SE. Auch bei *A. flavus* gab es bei einem größeren zeitlichen Entwicklungsvorsprung (zwei Tage) keine überlebenden Larven. Aus diesem Grund entfällt auch hier die Darstellung der Ergebnisse. Die verwendete Pilz-Linie hatte einen höchst signifikanten Einfluss und die Larvendichte einen signifikanten Einfluss auf das Überleben der Larven (vgl. Tab 6-3).

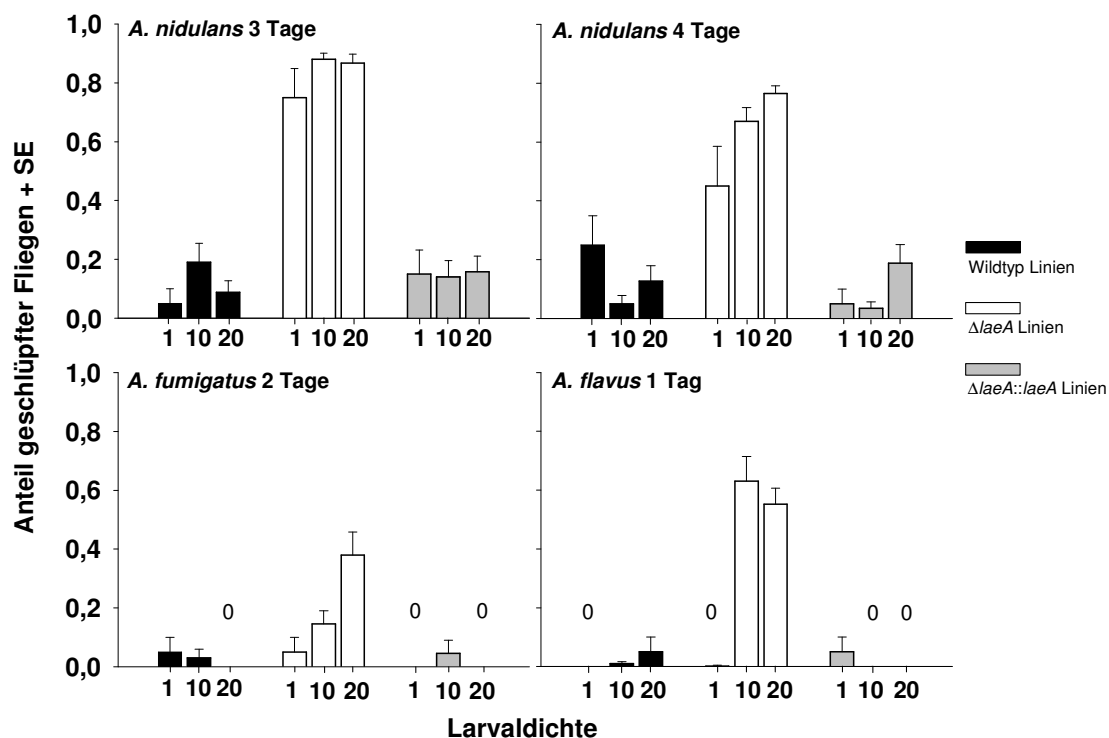


Abb. 6-5 Überleben von *D. melanogaster*-Larven bis zum Adultstadium konfrontiert mit *Aspergillus* ssp. WT, $\Delta laeA$ und $\Delta laeA::laeA$

Anteil an geschlüpften Fliegen + SE nach Konfrontation mit *Aspergillus* ssp. während der Larvalphase abhängig von der Larvendichte von 1, 10 bzw. 20, mit einem Entwicklungsvorsprung für *A. nidulans* von 3 bzw. 4 Tagen, für *A. fumigatus* von 2 Tagen bzw. für *A. flavus* von 1 Tag; nicht dargestellt sind die Ergebnisse von *A. fumigatus* und *A. flavus* mit einem Entwicklungsvorsprung von 3 bzw. 2 Tagen, aufgrund einer 100%igen Larvalmortalität; n = 20

Tab. 6-3 Statistik zum Überleben von *D. melanogaster*-Larven bis zum Adultstadium konfrontiert mit *Aspergillus* ssp. WT, $\Delta laeA$ -Mutanten sowie deren komplementären Linien bei unterschiedlichen Larvendichten (1, 10 und 20) und variierenden Entwicklungsvorsprünge der Pilze
SAS 9.1 GENMOD, durch reverse Eliminierung nichtsignifikanter Werte

	<i>A. nidulans</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>
	F _{1,233}	F _{2,130}	F _{1,100}
Alter	10.91**	-----	-----
Linie	380.37***	-----	269.21***
Dichte	4.42*	-----	4.77*
Alter x Dichte	6.31*	-----	-----
Dichte*Linie	-----	42.50***	-----

p < 0,05 = *; p < 0,01 = **; p < 0,001 = ***

6.2. Auswirkungen der Sekundärmetabolit-Defizienz auf die Pilzfitness

Im Vergleich zum Einfluss der Wildtype-Linien, war das Überleben der konkurrierenden *Drosophila*-Larven in Anwesenheit der chemisch defizienten $\Delta laeA$ Linien zumindest teilweise weniger beeinträchtigt. Transgene $\Delta laeA$ Pilze, die sich in Konkurrenz mit *D. melanogaster*-Larven befinden, so ist zu vermuten, sollten folglich ein stärker eingeschränktes Wachstum zeigen, wenn diese sich nicht mehr ausreichend durch ihre Mykotoxine schützen können. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Beeinflussung des Pilzwachstums durch *D. melanogaster*-Larven untersucht.

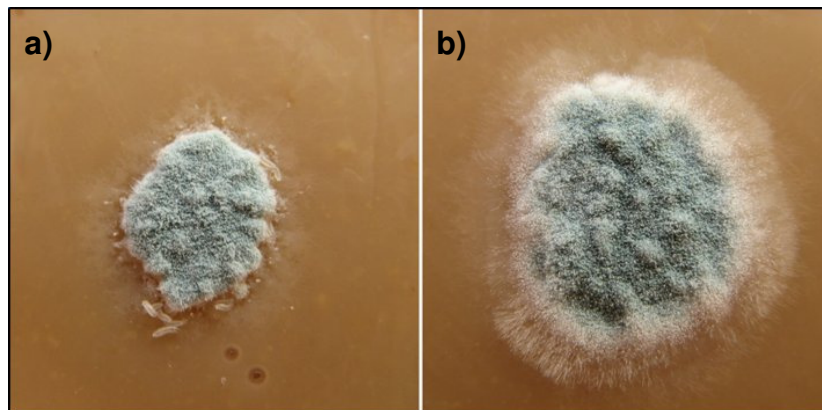


Abb. 6-6 *A. fumigatus* WT

Schimmelpilzkolonien **a)** konfrontiert mit *D. melanogaster*-Larven **b)** nicht konfrontiert.

6.2.1. Fitness Sekundärmetabolit-defizienter Schimmelpilze – Material und Methoden

Die Auswirkungen der Anwesenheit von *D. melanogaster*-Larven auf das Wachstum der Pilze wurden mittels Bildanalysen durchgeführt. Die Konfrontation fand in 2 mL Reaktionsgefäßen statt. Je Pilzart bzw. Linie wurden 1000 Konidien auf die Oberfläche des Mediums (DZM, 1 mL) appliziert und für 24 Stunden bei 25°C und einer Photoperiode von 14 Stunden vorinkubiert. Nach Ablauf der 24 Stunden wurden zur Hälfte der mit den jeweiligen Pilzlinien inokulierten experimentellen Einheiten jeweils 10 sterile L1 *D. melanogaster*-Larven eingesetzt (Zusammenfassung siehe Box 6-5). Die andere Hälfte ohne hinzugesetzte Larven diente als Kontrolle. 24 Stunden nach Larventransfer wurde mit der Dokumentation begonnen, die für den Zeitraum von 72 Stunden im Intervall von 6 Stunden fortgesetzt wurde. Das Oberflächenwachstum der Pilzkolonien wurde anschließend mit SigmaScan® (Pro Image Analysis 5.0.0) analysiert.

Box 6-5 Experimenteller Aufbau zur Pilzfitness von *Aspergillus* ssp. konfrontiert mit *D. melanogaster*-Larven bei einem Entwicklungsvorsprung von 24 h

Pilzarten	<i>A. nidulans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i>
Linie	WT, $\Delta laeA$ und $\Delta laeA::laeA$
Entwicklungsvorsprung	24 h
Anzahl Larven pro Einheit	10
Replikate	10

In einer Wiederholung des vorangegangenen Experiments wurde für *A. nidulans* und *A. fumigatus* der zeitliche Entwicklungsvorsprung der Pilze so gewählt, dass er der Mortalität der *D. melanogaster*-Larven vorhergehender Experimente angepasst war. Die Schimmelpilze wurden mit einem Vorsprung von 72 und 24 Stunden für *A. nidulans* und mit einem Vorsprung von 48 und 24 Stunden für *A. fumigatus* inokuliert. Da der im ersten Pilzfitnessexperiment gewählte zeitliche Vorsprung von 24 Stunden bereits mit der angestrebten Mortalität für *A. flavus* übereinstimmte, wurde mit *A. flavus* keine Wiederholung durchgeführt. Desweiteren wurden auch die komplementären Linien nicht verwendet, da zwischen ihnen und den Wildtyplinien kein Unterschied zu finden war (Zusammenfassung siehe Box 6-6). Auch im Wiederholungsexperiment wurde 24 Stunden nach dem Larventransfer mit der Dokumentation begonnen und ein Intervall von 6 Stunden für die Dauer von 72 Stunden eingehalten.

Box 6-6 Experimenteller Aufbau zur Pilzfitness von *Aspergillus* ssp. konfrontiert mit *D. melanogaster*-Larven bei variierendem Entwicklungsvorsprung

Pilzarten	<i>A. nidulans</i> , <i>A. fumigatus</i>
Linie	WT und $\Delta laeA$
Entwicklungsvorsprung	24 h und 72 h <i>A. nidulans</i> 24 h und 48 h <i>A. fumigatus</i>
Anzahl Larven pro Einheit	10
Replikate	10

Um das Ausmaß der Interaktion zwischen Konkurrenten durch die Reduktion von Wachstumsparametern zum Ausdruck zu bringen, wird von Botanikern häufig die Relative Konkurrenz Intensität (RKI) angegeben (READER et al. 1994). In dieser Arbeit wurde die Formel für die Berechnung der RKI für die Konkurrenzsituation zwischen Pilz und *D. melanogaster*-Larven angewandt. Hierbei wurde die Intensität des Einflusses beschrieben, die von den Insektenlarven auf das Wachstum der Pilzkolonien ausgeübt wurde. Sie zeigte sich im Ausmaß der Reduktion der Oberflächengröße einer Pilzkolonie durch die Anwesenheit konkurrierender Larven, in Relation zu eingenommenen Oberflächengrößen einer Pilzkolonie, die in Abwesenheit von Larven wachsen konnte. Sie wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\Delta\text{Koloniefläche} = \frac{\text{Deckungsgrad}_{\text{Konfrontation}} - \text{Deckungsgrad}_{\text{Kontrolle}}}{\text{Deckungsgrad}_{\text{Kontrolle}}}$$

Hierbei entspricht $\Delta\text{Koloniefläche}$ der RKI und der Deckungsgrad dem Verhältnis von bedeckter Substratoberfläche durch die Pilzkolonie zu Gesamtoberfläche des Substrates einer experimentellen Einheit. Wird ein Δ -Wert von „0“ erhalten, hatte die Anwesenheit der *D. melanogaster*-Larven keinen Einfluss auf die relative Koloniegröße der betrachteten Pilzlinie. Ein Wert von „-1“ hingegen deutet auf die vollständige Unterdrückung des Pilzwachstums hin.

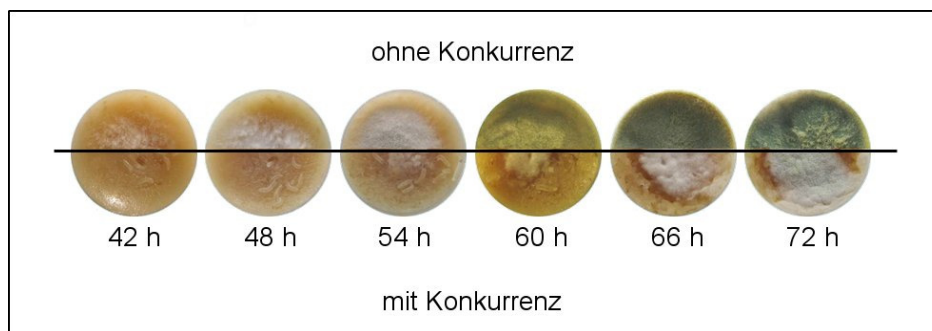


Abb. 6-7 Pilzwachstum von *A. nidulans* in Anwesenheit oder Abwesenheit von *D. melanogaster*-Larven

Wildtyp Kolonien von *A. nidulans* mit einem Entwicklungsvorsprung von 24 h wurden mit 10 *D. melanogaster*-Larven (L1 zu Beginn) konfrontiert (untere Reihe) als Kontrollen dienten nicht konfrontierte Pilzkolonien (obere Reihe). In Abständen von 6 Stunden wurde das Pilzwachstum per Bilddokumentation gemessen.

6.2.2. Fitness Sekundärmetabolit-defizienter Schimmelpilze – Ergebnisse

Die komplementären Linien ($\Delta\text{laeA}::\text{laeA}$) aller drei *Aspergillus* Arten unterschieden sich nicht statistisch signifikant in ihrem Wachstum von den Wildtyp-Linien derselben Art. Daher sind sie in der folgenden Darstellung der Ergebnisse nicht näher beschrieben. In den entsprechenden Abbildungen (Abb. 6-8) sind sie im Hintergrund dargestellt. In die statistische Auswertung der dargestellten Ergebnisse wurde die jeweilige Wildtyp-Linie mit der entsprechenden ΔlaeA -Line verglichen.

Aspergillus nidulans – 24 h

Bei einem Entwicklungsvorsprung von 24 Stunden wurde das Wachstum von *A. nidulans* WT und ΔlaeA in den ersten 30 Stunden der Konfrontation nahezu vollständig unterdrückt, womit die RKI nahe bei -1 lag (Abb. 6-8). Nach weiteren 12 Stunden begann der Wildtyp sich stärker gegen die konkurrierenden Larven durchzusetzen und bedeckte nach 84 Stunden einen Anteil der

Substratoberfläche, der sich marginal von konkurrenzfrei wachsenden Kolonien unterschied. Die Sekundärmetabolit-Defizitmutante hingegen wurde in ihrem Wachstum bis 54 Stunden nach Beginn der Konfrontation stark eingeschränkt (Abb. 6-8). 6 Stunden später konnte auch sie ihr Wachstum steigern. Bei Beendigung des Experiments nach 84 Stunden, bedeckte *A. nidulans* $\Delta laeA$ einen Anteil der Substratoberfläche, der 55% unter dem der Kontrollkolonien ohne Larven lag (Abb. 6-8).

Die Identität der verwendeten Linie von *A. nidulans* hatte einen signifikanten Einfluss auf die Konkurrenzfähigkeit der Pilzkolonien. Die Zeit und die Interaktion Zeit x Linie hatten einen höchst signifikanten Einfluss (vgl. Tab. 6-4 und 6-5).

***Aspergillus fumigatus* – 24 h**

A. fumigatus hatte im Vergleich zu *A. nidulans* bei gleichzeitiger Inokulation ein um ca. 18 Stunden verzögertes Wachstum. Während bei *A. nidulans* WT nicht konfrontierter Kolonien nach 48 Stunden ein Anteil von 0,50 der zur Verfügung stehenden Fläche bewachsen war, war es bei *A. fumigatus* ein Anteil von weniger als 0,01. Einen Anteil von 0,55 erreichte *A. fumigatus* im Vergleich dazu nach 66 Stunden. Die Sporulation setzt jedoch bei beiden Arten etwa zum selben Zeitpunkt, ca. 72 Stunden nach der Inokulation, ein (Daten nicht gezeigt). Sowohl der Wildtyp als auch die Defizitmutante $\Delta laeA$ von *A. fumigatus* wurden stark im Wachstum durch die Anwesenheit der Larven beeinträchtigt (Abb. 6-8). Erst nach 72 Stunden konnten die konfrontierten Kolonien beider Linien ihr Wachstum steigern und bedeckten nach 84 Stunden einen Anteil der um 53% (WT) bzw. 57% ($\Delta laeA$) unter dem der nicht konfrontierten Pilzkolonien lag (Abb. 6-8).

Der Einfluss der Larven auf das Wachstum beider Linien von *A. fumigatus* unterschiede sich statistisch nicht voneinander. Die Zeit hatte jedoch auch hier einen höchst signifikanten Effekt (vgl. Tab. 6-4 und 6-5).

***Aspergillus flavus* – 24 h**

Die Anwesenheit der Larven hatte auf das Wachstum beider Linien von *A. flavus* einen geringeren negativen Einfluss als bei den anderen beiden *Aspergillus* Arten (Abb. 6-8). Mit Ausgangswerten von -0,39 (WT) bzw. -0,70 ($\Delta laeA$) der relativen Konkurrenz Intensität (RKI) nach 30 Stunden Konfrontation, vergrößerte sich bei *A. flavus* die Koloniefäche stetig und erreichte nach 60 Stunden eine RKI die um 18% geringer war als bei der Defizitmutante (Abb. 6-8). Die Wachstumsverläufe von Wildtyp und Defizitmutante verliefen dabei fast parallel mit einem Unterschied von etwa 30 – 20% bei einem negativeren RKI-Wert der $\Delta laeA$ -Mutante. Bei Beendigung der Dokumentation (84 h) hatten die Larven keinen Einfluss auf das Wachstum der Pilzkolonien von *A. flavus* WT. *A. flavus* $\Delta laeA$ war hingegen noch immer in seinem Wachstum eingeschränkt (Abb. 6-8).

Statistisch waren die Unterschiede zwischen der Defizitmutante und dem Wildtyp von *A. flavus* höchst signifikant. Ebenso hatte die Zeit einen höchst signifikanten Einfluss auf die RKI (vgl. Tab. 6-4 und 6-5).

Im Gesamtmodell zeigten sich höchst signifikante Einflüsse der Identität des Schimmelpilzes und der Zeit als globale Faktoren, sowie weitere Interaktionen einzelner Parameter (vgl. Tab 6-4).

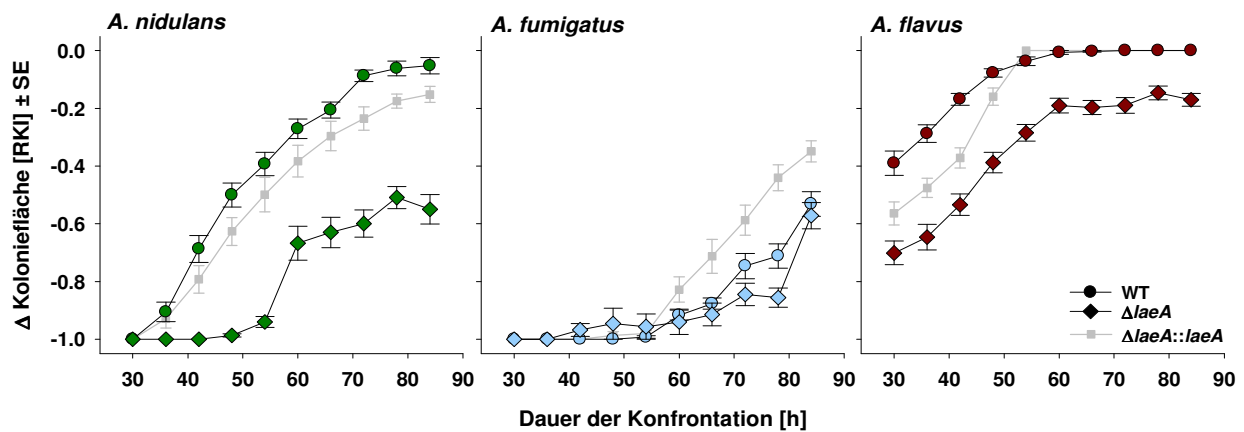


Abb. 6-8 Pilzwachstum von *Aspergillus* ssp. in An- und Abwesenheit konkurrierender *D. melanogaster*-Larven.

Wachstumsverläufe (angegeben als Δ Koloniefäche (RKI) \pm SE) von *A. nidulans*, *A. fumigatus* und *A. flavus* WT und $\Delta laeA$ -Mutanten in An- und Abwesenheit konkurrierender *D. melanogaster*-Larven. Im Hintergrund sind die Werte der komplementären Linien in grau angegeben; n = 10

Tab. 6-4 Statistik zum Pilzwachstum von *Aspergillus* ssp. in An- und Abwesenheit konkurrierender *D. melanogaster*-Larven – Gesamtmodell

MIXED Prozedur SAS 9.1

	d.f.	F
Art	2,53	45.28***
Linie	1,53	0.01
Zeit	1,517	600.89***
Linie x Art	2,53	9.20***
Zeit x Art	2,517	17.89***
Zeit x Linie	1,517	9.35**
Zeit x Linie x Art	2,517	17.60***

p < 0,05 = *; p < 0,01 = **; p < 0,001 = ***

Tab. 6-5 Statistik zum Pilzwachstum von *Aspergillus* ssp. in An- und Abwesenheit konkurrierender *D. melanogaster*-Larven – post hoc Test

MIXED Prozedur von SAS 9.1

	<i>A. nidulans</i>		<i>A. fumigatus</i>		<i>A. flavus</i>	
	d.f.	F	d.f.	F	d.f.	F
Linie	1,18	7.96*	1,17	1.36	1,18	20.05***
Zeit	1,177	332.44***	1,162	121.31***	1,178	176.50***
Zeit x Linie	1,177	32.72***	1,162	1.74	1,178	5.54*

p < 0,05 = *; p < 0,01 = **; p < 0,001 = ***

***Aspergillus nidulans* – 72 h und 24 h**

A. nidulans WT mit 24 Stunden Entwicklungsvorsprung wurde bis 30 Stunden nach Konfrontationsbeginn zu 100% im Wachstum unterdrückt (RKI: $-1 \pm 0,0$ SE), konnte jedoch im Anschluss zu jeder weiteren Dokumentation im 6 Stunden Rhythmus seine Kolonieoberfläche erweitern (Abb. 6-9), sodass sich nach 78 Stunden Konfrontation ein geringe RKI ergab. Die $\Delta laeA$ -Defizitmutante hingegen war über den gesamten Verlauf des Experiments nicht in der Lage ihr Wachstum zu steigern. Die RKI lag zum Ende des Experimentes um ca. 83% unter der des Wildtyps.

Bei 72 Stunden Entwicklungsvorsprung veränderte sich die von den Pilzkolonien bedeckte Fläche kaum, weder beim Wildtyp noch bei der Defizitmutante (Abb. 6-9). Beide Wachstumsverläufe lagen in etwa parallel, jedoch war die RKI bei der Defizitmutante dabei im Mittel um 28% höher als die des Wildtyps.

Für *A. nidulans* haben alle Erklärungsvariablen, Linie, Zeit und Alter sowie deren Interaktionen, einen höchst signifikanten Einfluss auf die RKI (vgl. Tab. 6-6).

***Aspergillus fumigatus* – 48 h und 24 h**

A. fumigatus WT und $\Delta laeA$ unterschieden sich bei einem Entwicklungsvorsprung von 24 Stunden in ihrem Wachstumsverlauf nicht voneinander (Abb. 6-9). Beide Pilzlinien wurden bis 60 Stunden nach Beginn der Konfrontation stark in ihrem Wachstum von den Larven unterdrückt. Ab 66 Stunden nach Beginn konnten beide Linien ihre Kolonieoberfläche steigern und erreichten nach 84 Stunden eine RKI die bei der Sekundärmetabolit-Defizitmutante um 23% höher war als die des Wildtyps (Abb. 6-9).

Wurde *A. fumigatus* 48 Stunden vor dem Transfer der Larven inokuliert, bedeckte der Wildtyp 30 Stunden nach dem Larventransfer eine deutlich geringere Substratoberfläche als Kolonien, die ohne die Konkurrenz von Larven wachsen konnten (Abb. 6-9). Gleiches gilt für die $\Delta laeA$ -Mutante, die hier ein etwas weniger reduziertes Wachstum aufwies. Beide Linien vergrößerten ihre Oberfläche im Verlauf der Konfrontation und erreichten nach 84 Stunden ähnliche RKI-Werte (Abb. 6-9).

In der Interaktion zwischen *A. fumigatus* und *D. melanogaster* hatte die Zeit und der Entwicklungsvorsprung des Pilzes (Alter) einen höchst signifikanten Einfluss auf die RKI (vgl. Tab 6-6). Die Erklärungsvariablen Linie sowie Interaktionen zwischen den Erklärungsvariablen hingegen hatten keinen signifikanten Einfluss (vgl. Tab 6-6).

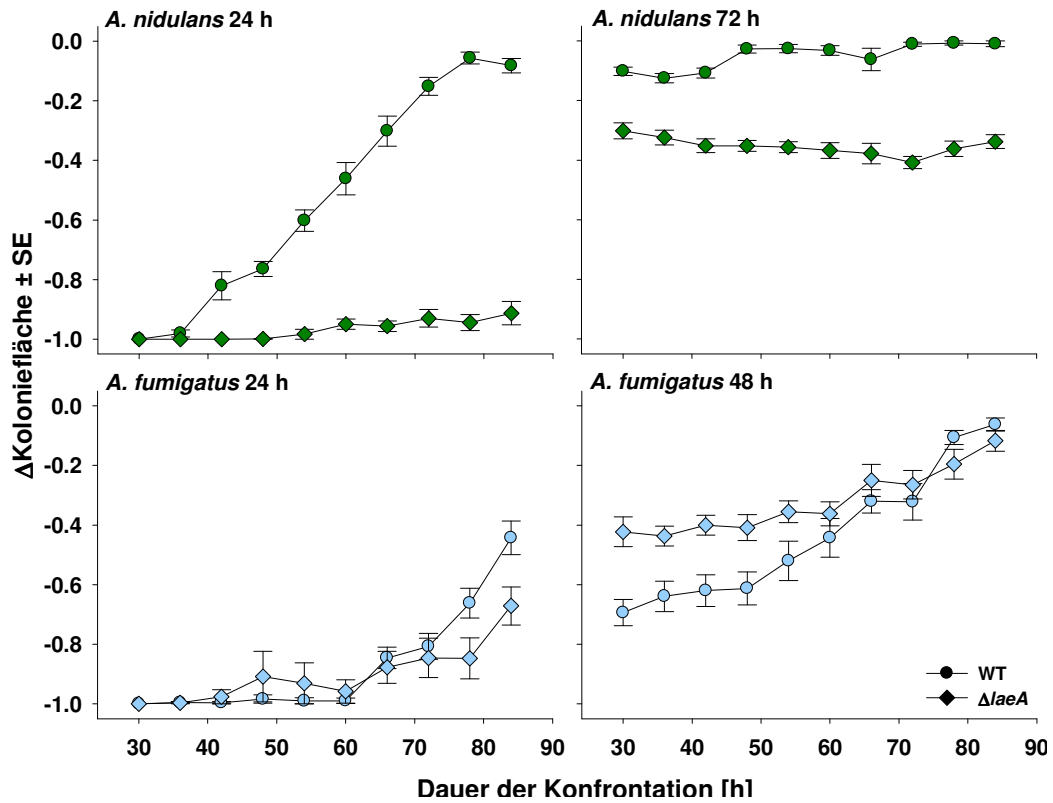


Abb. 6-9 Pilzwachstum von *A. nidulans* und *A. fumigatus* in An- und Abwesenheit konkurrierender *D. melanogaster*-Larven

Wachstumsverläufe (angegeben als Δ Koloniefläche (RKI) \pm SE) von *A. nidulans* mit einem Entwicklungsvorsprung des Pilzes von 24 bzw. 72 h und *A. fumigatus* von 24 und 48 h, jeweils der WT und $\Delta laeA$ -Linien; n = 10

Tab. 6-6 Statistik zum Pilzwachstum von *A. nidulans* und *A. fumigatus* in An- und Abwesenheit konkurrierender *D. melanogaster*-Larven; MIXED Prozedur von SAS 9.1

	<i>A. nidulans</i>		<i>A. fumigatus</i>	
	d.f.	F	d.f.	F
Linie	1,36	104.46***	1,36	0.00
Zeit	1,393	407.71***	1,376	17.62***
Alter	1,36	697.39***	1,36	28.18***
Zeit x Linie	1,393	224.24***	1,376	0.48
Alter x Linie	1,36	49.37***	1,36	1.73
Zeit x Alter	1,393	251.62***	1,376	0.27
Zeit x Alter x Linie	1,393	77,56***	1,376	0.30

p < 0,05 = *; p < 0,01 = **; p < 0,001 = ***

6.3. Beeinflussung des Sekundärmetabolismus durch weitere Faktoren

Velvet – Lichtabhängige Toxinproduktion

Der Velvet-Komplex ist ein heterotrimerer Proteinkomplex bestehend aus VeA (*velvet protein*), VelB (*velvet-like protein*) und LaeA (BAYRAM et al. 2008). Während LaeA konstitutiv im Zellkern exprimiert wird, sind VelB und VeA, abhängig von den Lichtverhältnissen, im Zellkern oder im Zytoplasma zu finden. Die Expression von *veA* sowie der Transport des Produktes in den Zellkern sind in Abwesenheit von Licht erhöht. Ein Einfluss von Licht auf die Synthese von VelB konnte hingegen nicht gezeigt werden. VeA fördert durch die außerhalb des Zellkerns stattfindende Bildung eines Komplexes mit VelB in Dunkelheit den Transport von VelB in den Zellkern über das α -Importin KapA.

Nach einem Model von Bayram et al. (2008) bilden VeA und VelB mit LaeA im Zellkern einen trimeren Komplex, wobei VeA die beiden anderen Proteine verbindet (Abb. 6-10). Durch diese Verbindung scheint die regulatorische Aktivität von LaeA gefördert zu werden. Bei Licht ist sie reduziert, da weniger VeA im Zytoplasma vorhanden ist und so in einem geringeren Maße in den Zellkern transportiert werden kann. Durch diese Verbindung wird die Sekundärmetaboliten Regulation durch LaeA mit einer durch Licht inhibierten bzw. in Dunkelheit geförderten Regulation verknüpft.

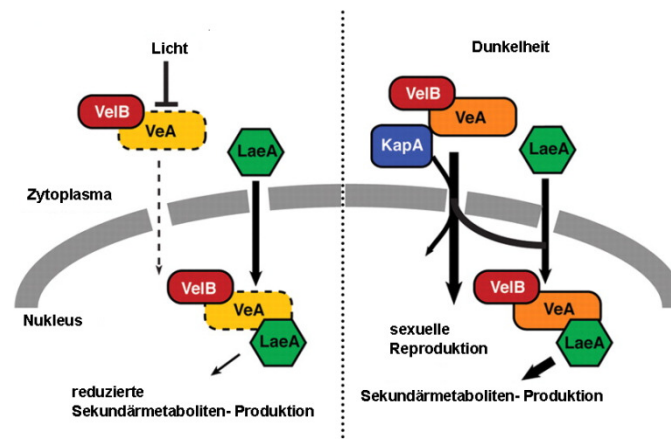


Abb. 6-10 Velvet-Komplex

Heterotrimerer Komplex bestehend aus **VeA**, **VelB** und **LaeA**, schematische Darstellung der Unterschiede bei Licht und Dunkelheit; verändert nach BAYRAM et al. 2008

Sowohl die ΔveA als auch die $\Delta laeA$ -Mutante zeigten eine deutlich reduzierte Sterigmatocystin-Synthese, bei $\Delta velB$ war die Sterigmatocystin-Produktion zeitlich verzögert und nur leicht reduziert (BAYRAM et al. 2008). VelB und VeA scheinen aber unabhängig von LaeA weiterer Funktionen in der Entwicklung und Sporulation von *A. nidulans* zu haben, wie Untersuchungen mit Deletionsmutanten zeigten.

Die Verwendung von Velvet-Mutanten soll zeigen, ob andere regulatorische Faktoren, die die Sekundärmetaboliten-Produktion beeinflussen, ähnliche Auswirkungen auf die Interaktion zwischen Schimmelpilzen und Insekten haben, wie sie oben für LaeA offengelegt wurden.

Oxylipine – Psi-Faktor als Regulator

Oxylipine (oxidierte ungesättigte Fettsäuren) sind in Pilzen als eine der wenigen extrazellulären Signale, welche die asexuelle und sexuelle Fortpflanzung regulieren, identifiziert worden (TSITSIGIANNIS & KELLER 2007). Zusammengefasst werden sie als Psi-Faktoren (*precocious sexual inducer*) benannt und stellen hormonähnliche Derivate von Fettsäuren dar, z.B. von Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure. Durch unterschiedliche Konzentrations-verhältnisse verschiedener Oxylipine, wird das Verhältnis von sexueller (meiotischer) zu asexueller (mitotischer) Reproduktion in *A. nidulans* reguliert (TSITSIGIANNIS et al. 2004). Drei Fettsäure-Oxygenasen konnten in *A. nidulans* bestimmt werden, die zur Synthese der Psi-Faktoren beitragen: PpoA, PpoB und PpoC (*psi-producing oxygenases*). *PpoA* kodiert für eine Fettsäure Oxygenase, die zur Synthese von psiB α , ein Derivat der Linolsäure, benötigt wird. *PpoB* und *ppoC* kodieren beide für Oxygenasen die zur Synthese von Ölsäure-Derivaten in Form von psiB β benötigt werden (TSITSIGIANNIS & KELLER 2006). Über die Regulation der Reproduktion hinaus, wurde von Tsitsigiannis der Einfluss der Psi-Faktoren auf die Produktion von Sekundärmetaboliten wie Sterigmatocystin (ST) und Penicillin (PE), einem Mykotoxin bzw. dem bekannten antibiotisch wirkenden Stoff, untersucht. Die Deletion von *ppoB* ($\Delta ppoB$) führte zur frühzeitigen Synthese von ST, die im Vergleich zum Wildtyp gesteigert war. Ebenso produzierten Kolonien der $\Delta ppoC$ -Mutante nach 4 Stunden mehr ST als der Wildtyp, die $\Delta ppoA$ -Mutante hingegen nach 6 Stunden weniger. Nach 8 Stunden war kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und den beiden Mutanten $\Delta ppoC$ und $\Delta ppoA$ mehr festzustellen, die $\Delta ppoB$ -Mutante hingegen wies noch immer eine höhere ST Konzentration auf (TSITSIGIANNIS & KELLER 2006). Dies deutet auf eine komplexe und zeitlich variable Regulation verschiedener metabolischer Prozesse durch die Oxylipine hin. Eine Doppel- bzw. Tripel-Mutante $\Delta ppoAC$ bzw. $\Delta ppoABC$ war zu keinem Zeitpunkt in der Lage ST in messbaren Konzentrationen zu synthetisieren. Gleichzeitig zeigten diese Mutanten eine Überproduktion an Penicillin (PE) (TSITSIGIANNIS & KELLER 2006, 2007). Die genauen Funktionsweisen bzw. Signalketten der Oxylipine in der Sekundärmetaboliten-Produktion sind bislang nicht bekannt.

Durch strukturelle Ähnlichkeit der Oxylipine in Pilzen und Pflanzen vermuten Tsitsigiannis und Keller (2006), dass sie in der Kommunikation zwischen verschiedenen Arten verschiedener Reiche (*cross kingdom communication*) eine bedeutende Rolle spielen. Es konnte gezeigt werden, dass Oxylipine aus Pflanzen Entwicklungsprozesse (beispielsweise die Sporulation) in drei verschiedenen Pilzen der Gattung *Aspergillus* beeinflussen (BUROW et al. 1997, CALVO et al. 1999). Daher vermuten sie, dass Oxylipine, auch anderer Organismen, als Liganden für G-Protein-gebundene Rezeptoren wirken und über die Bindung an diese Rezeptoren eine Signalkaskade auslösen (Abb. 6-11). Hierbei findet die Regulation im weiteren Verlauf auf transkriptioneller Ebene statt (TSITSIGIANNIS & KELLER 2006).

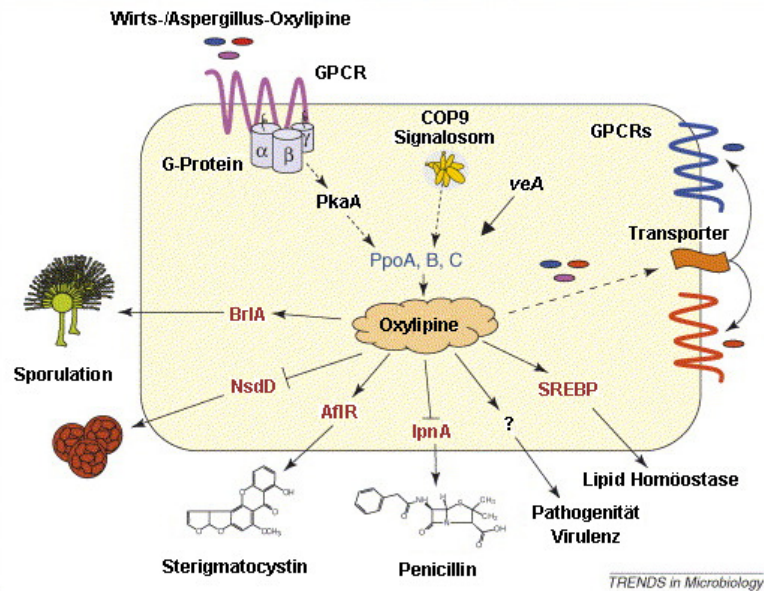


Abb. 6-11 Hypothetisches Model der Signalweitergabe über Oxylipine

Oxylipine werden über membrangebundene G-Proteine in das Innere der Pilzzelle weitergeleitet und sind dort in Signalkaskaden involviert; **Hypothese**: zusätzlich zur internen Regulation können Oxylipine die Zelle verlassen und als Liganden an eigenen oder GPCRs von Wirtszellen binden. Transkriptionsfaktoren: **BriA**-Kondienbildung (asexuell), **NsdD** – Sporenbildung (sexuell), **AfIR** und **IpnA**- Sekundärmetaboliten-Produktion, **SREBP** – Lipid-Homöostase; **PkaA** - Proteinkinase A; **veA** – lichtsensitiver Transkriptionsfaktor; **COP9** – Abbau von Proteinen; **GPCRs** – G-Protein gebundener Rezeptor; verändert nach TSITSIGIANNIS und KELLER 2007

In Pflanzen sind Oxylipine an zahlreichen Reaktionen der Verteidigung gegen Herbivore und Pathogene beteiligt. Sie lösen verschiedene Reaktionskaskaden aus, an denen sowohl direkt wirkende Substanzen, z.B. Inhibitoren, als auch indirekt wirkende Substanzen beteiligt sind, z.B. Volatile (green leaf volatiles), die Prädatoren oder Parasitoide anlocken (BLÉE 2002, HALITSCHKE & BALDWIN 2004). Unterbrechungen bestimmter Teile des Oxylipin-Regulationsweges führen zu einer veränderten Synthese von Sekundärmetaboliten, was einhergeht mit gesteigerter Schädigung durch Herbivorie (KESSLER et al. 2004). Ob eine Mutation in der Oxylipinsynthese bei den Schimmelpilzen ebenfalls zu Veränderungen in der Fähigkeit sich gegen Antagonisten zu verteidigen führt, soll der Einsatz von Oxylipin-Mutanten zeigen.

6.3.1. Weitere Sekundärmetabolit-defiziente Pilzmutanten – Material und Methoden

Velvet-Mutanten

Jeweils 10 sterile *D. melanogaster*-Larven wurden in 2 mL Reaktionsgefäße mit *A. nidulans* WT-*veA* und der Δ *veA*-Mutante (3 Tage Entwicklungsvorsprung) bzw. *A. fumigatus* WT und der Δ *veA*-Mutante (2 Tage Entwicklungsvorsprung) konfrontiert. Die Reaktionsgefäße wurden bei 25°C und einem Tag-/Nachtrhythmus von 12/12 Stunden inkubiert. Zur Kontrolle wurden Reaktionsgefäße mit pilzfremem Medium präpariert (Zusammenfassung siehe Box 6-7).

Box 6-7 Experimenteller Aufbau zum Überleben von *D. melanogaster*-Larven bis zum Adultstadium konfrontiert mit *A. nidulans* und *A. fumigatus* Velvet-Defizitmutanten

Pilzarten	<i>A. nidulans</i> und <i>A. fumigatus</i>
Linie	WT- <i>veA</i> , ΔveA
Entwicklungsvorsprung [d]	3 <i>A. nidulans</i> 2 <i>A. fumigatus</i> Kontrolle
Anzahl Larven pro Einheit	10
Replikate	20

Oxylipin-Mutanten

Die Auswirkung von vier verschiedenen Oxylipin-Defizitmutanten und einer Überexpressions-Mutante wurde mit jeweils 10 sterilen *D. melanogaster*-Larven in 2 ml Reaktionsgefäßen überprüft. Hierzu wurden die Pilze 1, 2 bzw. 3 Tage vor dem Larventransfer inokuliert und bei 25°C und einem Tag-/Nachtrhythmus von 12/12 Stunden vorinkubiert (Zusammenfassung siehe Box 6-8).

Box 6-8 Experimenteller Aufbau zum Überleben von *D. melanogaster*-Larven bis zum Adultstadium konfrontiert mit *A. nidulans* Oxylipin-Mutanten Δppo unterschiedlicher Entwicklungsvorsprünge

Pilzarten	<i>A. nidulans</i>
Linie	WT- <i>veA</i> , $\Delta ppoB$, $\Delta ppoAC$, $\Delta ppoA$, $\Delta ppoABC$, OE <i>ppoA</i>
Entwicklungsvorsprung [d]	1, 2 und 3; Kontrolle
Anzahl Larven pro Einheit	10
Replikate	20

Zu einem späteren Zeitpunkt wurde das oben beschriebene Experiment unter gleichen Bedingungen wiederholt. In diesem Fall wurde den Pilzkolonien kein zeitlicher Entwicklungsvorsprung gewährt (Zusammenfassung siehe Box 6-9).

Box 6-9 Experimenteller Aufbau zum Überleben von *D. melanogaster*-Larven bis zum Adultstadium konfrontiert mit *A. nidulans* Oxylipin-Mutanten Δppo ohne Entwicklungsvorsprung

Pilzarten	<i>A. nidulans</i>
Linie	WT- <i>veA</i> , $\Delta ppoB$, $\Delta ppoAC$, $\Delta ppoA$, $\Delta ppoABC$, OE <i>ppoA</i>
Entwicklungsvorsprung [d]	0 Tage; Kontrolle
Anzahl Larven pro Einheit	10
Replikate	20

6.3.2. Weitere Sekundärmetabolit-defiziente Pilzmutanten – Ergebnisse

Velvet-Mutanten

Die mit drei Tage alten *A. nidulans* WT-*veA* konfrontierten Larven hatten nur eine geringe Überlebenswahrscheinlichkeit (Abb. 6-12). Die ΔveA -Mutante ermöglichte es hingegen, dass 20% mehr Larven bis zum Adultstadium überlebten.

Die Konfrontation mit zwei Tage alten *A. fumigatus* Kolonien, sowohl mit WT-*veA*- als auch der ΔveA -Linie, führte zu einer 100%igen Mortalität. Es konnte eine höhere Larvalaktivität im Rahmen einer verstärkten Bioturbation in den Ansätzen mit ΔveA -Mutanten beobachtet werden, im Vergleich zu Ansätzen mit der WT-*veA*-Linie. Dies lässt darauf schließen, dass die Larven in Anwesenheit der Defizitmutante für eine längere Zeit überleben konnten. Dennoch war keine Larve in der Lage, sich bis zum Adulttier zu entwickeln.

Aufgrund der 100%igen Mortalität in Anwesenheit der *A. fumigatus* Linien, gingen diese Werte nicht in die statistische Auswertung mit ein. Für *A. nidulans* ergab sich ein höchst signifikanter Einfluss der Mutation auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Larven (Abb. 6-12).

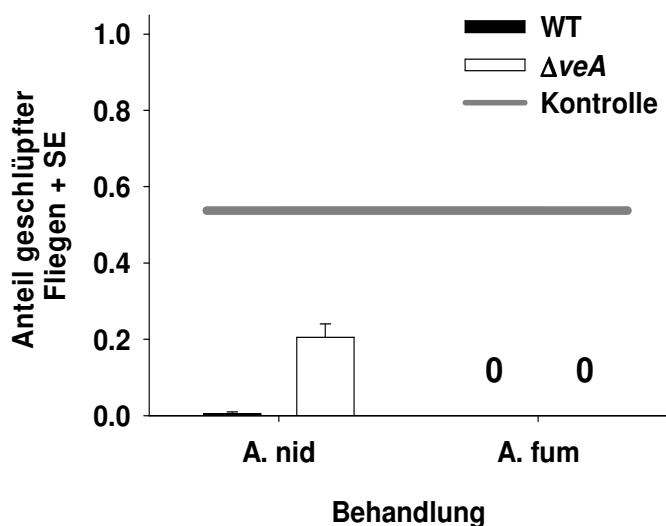


Abb. 6-12 Überleben von *D. melanogaster*-Larven bis zum Adultstadium konfrontiert mit *A. nidulans* und *A. fumigatus* Velvet-Mutanten

A. nidulans Linie: $F_{1,38} = 155.94$; $p < 0,0001$; SAS 9.1 GENMOD

Oxylipin-Mutanten – mit Entwicklungsvorsprung

Das Überleben der Larven, die sich in Anwesenheit der mit einem Tag Zeitvorsprung inokulierten Wildtyp Kolonien (WT-*veA*) entwickeln mussten, war auf einen Anteil von 0,38 reduziert (Kontrolle 0,95) (Abb. 6-13). Im Vergleich dazu reduzierte sich die Anzahl an geschlüpften Fliegen noch einmal bei den Oxylipin-Mutanten $\Delta ppoB$, $\Delta ppoAC$, $\Delta ppoA$ um 18%, 20% bzw. 12%. Die Konfrontation mit der Tripelmutante $\Delta ppoABC$ resultierte in der größten Anzahl geschlüpfter Fliegen (Abb. 6-13), hingegen konnten die mit der Überexpressions-Mutante *OEppoA* konfrontierten Larven nur zu einem geringen Anteil bis zum Adultstadium überleben (Abb. 6-13).

In der Konfrontation mit Kolonien die zwei Tage vor dem Larventransfer inokuliert wurden, lag die Anzahl der geschlüpften Fliegen weit unter der Anzahl der Larven, die mit einen Tag alten Kolonien konfrontiert wurden (Abb. 6-13). Auch hier entwickelten sich die Larven, die sich in Anwesenheit der Tripel-Mutante befanden, mit dem höchsten Anteil. Die anderen Defizitmutanten sowie die Überexpressions-Mutante führten wie zuvor zu einer hohen Mortalität, sodass die Anzahl geschlüpfter Fliegen nahe bei null lag (Abb. 6-13).

Ähnliche Ergebnisse wurden bei drei Tagen Entwicklungsvorsprung der Pilze erhalten. Die Konfrontation mit der Tripel-Mutante führte mit einem Anteil von 0,42 zum höchsten Überleben der Larven, während der Wildtyp, die übrigen Defizitmutanten und die Überexpressions-Mutante, eine hohe Mortalität verursachten (Abb. 6-13).

Die statistische Analyse der Daten ergab einen global höchst signifikanten Einfluss des Alters der Pilzkolonien, sowie global einen hoch signifikanten Einfluss der Mutation auf das Überleben der *D. melanogaster*-Larven. Darüber hinaus war der Einfluss der höheren Interaktion des Alters höchst und der Interaktion des Alters mit der Mutation hoch signifikant (vgl. Tab. 6-7).

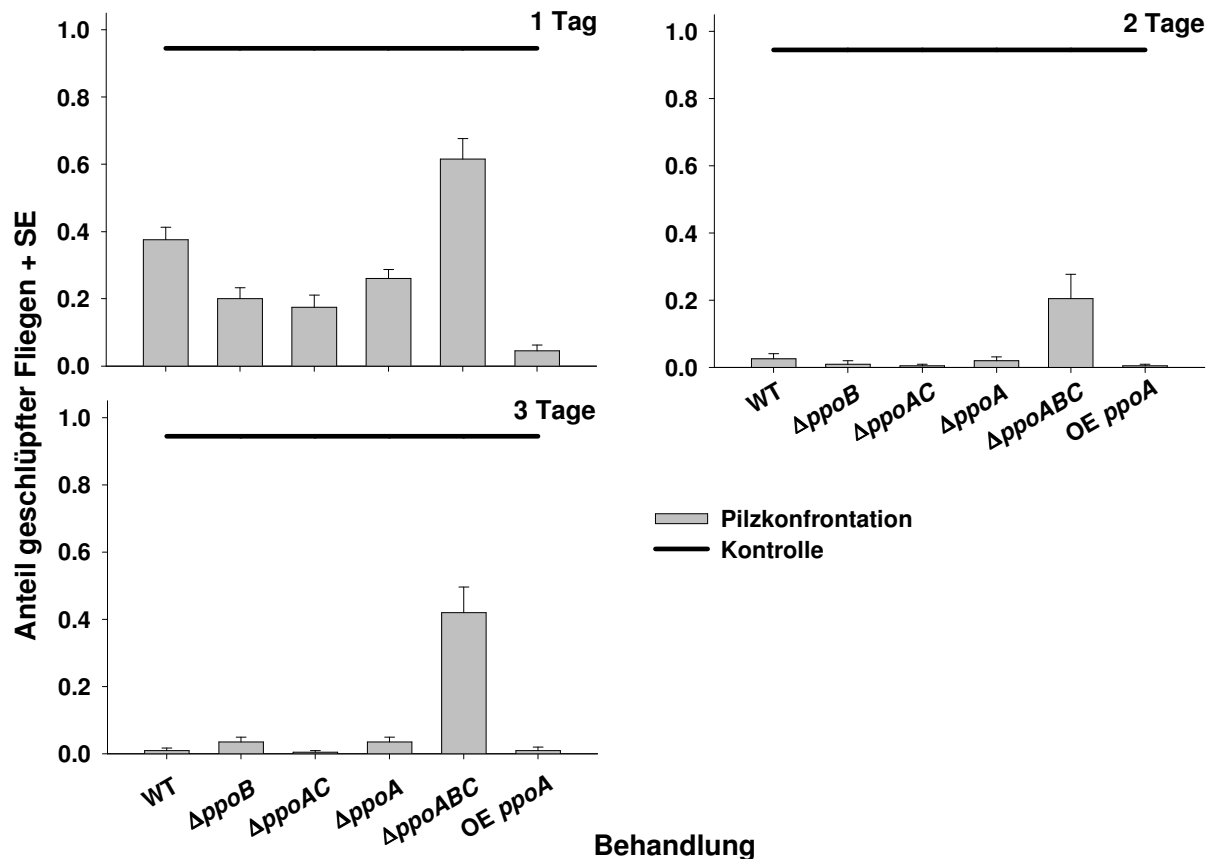


Abb. 6-13 Überleben von *D. melanogaster*-Larven bis zum Adultstadium konfrontiert mit *A. nidulans* Oxylinmutanten

Anteil geschlüpfter Fliegen + SE konfrontiert mit *A. nidulans* $\Delta ppoB$, $\Delta ppoAC$, $\Delta ppoA$, $\Delta ppoABC$ und OEppoA-Mutanten mit einem Entwicklungsvorsprung von 1 bis 3 Tagen; der Wert der nicht konfrontierten Larven (Kontrolle) ist als Linie dargestellt; n = 20

Tab. 6-7 Statistik zum Überleben von *D. melanogaster*-Larven bis zum Adultstadium konfrontiert mit Oxylin-Mutanten SAS 9.1 GENMOD, nach der Methode der reversen Eliminierung nichtsignifikanter Werte

	d.f.	F
Alter	1,352	54.39***
Linie	2,352	6.21**
Alter x Alter	1,352	35.29***
Alter x Linie	2,352	6.71**

** p < 0.01, *** p < 0.001

Oxylipin-Mutanten – ohne Entwicklungsvorsprung

In der Wiederholung des vorangegangenen Experiments wurden die Pilzkolonien am selben Tag inokuliert, an dem auch die sterilen Larven in die experimentellen Einheiten transferiert wurden. Die Ergebnisse entsprechen annähernd denen des vorangegangenen Experiments, in welchem die Pilze einen Tag vor dem Larventransfer inokuliert wurden (Abb. 6-14). Der Wildtyp und die Oxylipin-Defizitmutanten reduzierten deutlich den Anteil überlebender Larven, mit Ausnahme der Tripel-Mutante, in deren Anwesenheit sich mit einem Anteil von 0,71 die höchste Überlebenschance der Larven ergab. Auch in dem Wiederholungsexperiment führte die Konfrontation mit der Überexpressions-Mutante OEppoA mit einem Anteil von 0,08 zur niedrigsten Anzahl an geschlüpften Fliegen (Abb. 6-14).

Auch hier ergab die statistische Auswertung einen höchst signifikanten Einfluss der Mutation auf das Überleben der *D. melanogaster*-Larven (siehe Abb. 6-14).

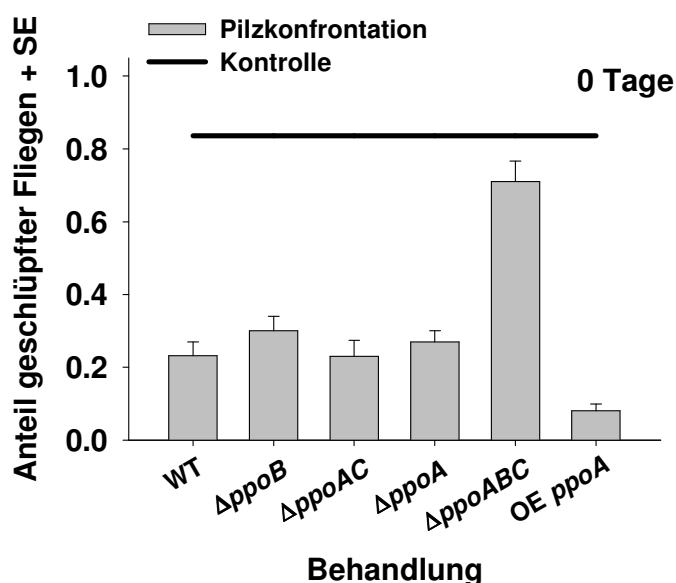


Abb. 6-14 Überleben von *D. melanogaster*-Larven bis zum Adultstadium konfrontiert mit *A. nidulans* Oxylipin-Mutanten ohne Entwicklungsvorsprung

Anteil geschlüpfter Fliegen + SE konfrontiert mit *A. nidulans* $\Delta ppoB$, $\Delta ppoAC$, $\Delta ppoA$, $\Delta ppoABC$ und OEppoA-Mutanten; der Wert der nicht konfrontierten Larven (Kontrolle) ist als Linie dargestellt; n = 20; $F_{5,112} = 21.74$, $p < 0,0001$; SAS 9.1 GENMOD

6.4. Sekundärmetabolit-Defizitmutanten: LaeA, Velvet und Oxylipine – Diskussion

Drosophila melanogaster ist durch ihre Lebensweise auf verrottendem organischem Material oft mit zahlreichen Mikroorganismen konfrontiert. Nicht alle von ihnen werden, wie beispielsweise zahlreiche Hefearten, als Nahrungsgrundlage genutzt, sondern üben eine pathogene Wirkung aus.

Aufgrund der ständigen Konfrontation mit potenziell pathogenen Mikroorganismen, zeigt das Immunsystem von *D. melanogaster* vermutlich besondere Anpassungen. Es verfügt, nach bisherigem Wissensstand, über 20 induzierbare antimikrobiell wirkende Peptide (AMPs), die ein weites Wirkungsspektrum abdecken (LEMAITRE & HOFFMANN 2007). Die antimikrobiellen Peptide *Drosomycin* und *Metchnikowin* wirken antifungal gegen zahlreiche pilzliche Antagonisten. Für das AMP *Cecropin* wurden überwiegend antibakterielle Wirkungen gegen gram-negative Bakterien nachgewiesen, Tests zeigten jedoch auch ein weites Wirkungsspektrum gegen verschiedene Pilzarten (EKENGREN & HULTMARK 1999). Dem ungeachtet ist es einigen entomopathogenen Pilzen, wie z.B. *Beauveria bassiana*, möglich, Insekten inklusive *D. melanogaster* zu infizieren.

A. flavus ist unter den Aspergillen der Hauptverursacher pilzlicher Infektionen in Insekten (CAMPBELL 1994). Auch *A. fumigatus* kann als opportunistisches Pathogen wirken. Dennoch war keine der verwendeten *Aspergillus* Arten, weder die Sekundärmetabolit-Defizitmutanten noch der Wildtyplinien, in der Lage, die Larven von *D. melanogaster* erfolgreich zu infizieren.

Obwohl *B. bassiana* unter adulten Fliegen von *D. melanogaster* zu extrem hoher Mortalität führen kann, konnte auch hier keine Infektion von *Drosophila*-Larven mit *B. bassiana* beobachtet werden (KRAAIJEVELD & GODFRAY 2008). Ob dies besonders effektiven Gegenmaßnahmen des Immunsystems von *Drosophila*-Larven zuzuschreiben ist, oder darauf zurückzuführen ist, dass die Larven sich im Substrat vergraben und dabei von außen anheftende Sporen/Konidien abstreifen, ist unklar.

Ein oraler Infektionsweg über die Aufnahme von Konidien zusammen mit dem Nahrungssubstrat, wobei die Konidien innerhalb des Verdauungstraktes, z.B. während der Darmpassage, auskeimen können, ist denkbar. Das antifungale AMP Drosomycin wird in den Speicheldrüsen und anderen Organen von *Drosophila*, sowohl konstitutiv als auch in verstärktem Maße bei Konfrontation induziert, exprimiert (TZOU et al. 2000). Cecropin, das die Keimung von Konidien effektiv hemmen kann (EKENGREN & HULTMARK 1999), wird in Proventriculus und Mitteldarm durch Induktion exprimiert (TZOU et al. 2000), darüber hinaus ebenfalls durch Induktion in anderen Organen (TINGVALL et al. 2001). Somit können diese AMPs einer Abwehr gegen potenziell mit der Nahrung aufgenommene pathogen wirkende Organismen dienen.

Trotz fehlender Hinweise auf eine entomopathogene Infektion im Larvalstadium, findet die Hauptmortalität während dieser Phase statt. In dieser Zeit nehmen die Larven mit ihrer Nahrung auch die von den Schimmelpilzen zur extrazellulären Verdauung und zum Schutz ihrer Ressource in das Substrat sekretierte Stoffe, so die Hypothese, mit auf.

Dass die Sekundärmetabolite respektive Mykotoxine, die mit der Nahrung aufgenommen werden, die Mortalität unter den *D. melanogaster*-Larven verursachen, zeigte sich in der Verwendung verschiedener Schimmelpilzlinien. Schimmelpilze die in der Lage waren, einen größeren Bestand an Sekundärmetaboliten zu produzieren, führten zu einer stärker verringerten Entwicklungsfähigkeit der Larven bis zur adulten Fliege. Dieses galt gleichermaßen für verschiedene Pilzarten, die über eine unterschiedliche Zusammensetzung und Anzahl an Mykotoxinen verfügen, als auch für Linien derselben Art, die durch genetische Manipulation einen Teil ihrer Sekundärmetabolit-Gene nicht mehr exprimieren konnten. Der molekulargenetische Vorgang der Manipulation selbst hat hierbei jedoch keine Auswirkungen auf die Interaktion zwischen den Schimmelpilzen und *D. melanogaster*, wie die Überlebensdaten aus den Konfrontationen mit komplementären Linien zeigten. Eine erhöhte Larvendichte führte nur bei den *LaeA*-Defizitmutanten zu einer vorteilhaften Entwicklung der Larven und dies war z.T. abhängig vom Entwicklungsvorsprung des Pilzes. Der Allee-Effekt, der bei anderen Insekten-Schimmelpilz-Interaktionen gezeigt werden konnte (ROHLFS 2005b, ROHLFS et al. 2005), scheint hier nur für die Schimmelpilz-Linien zuzutreffen, die über ein reduziertes Potenzial an Mykotoxinen verfügen.

Es ist zu bemerken, dass die *LaeA*-Defizitmutante von *A. nidulans* auf dem verwendeten Medium ein anderes Wachstumsverhalten im Vergleich zum Wildtyp zeigt. Die Unterschiede liegen in einem verlangsamten Wachstum und einer verzögerten Sporulation der *LaeA*-Defizitmutante im Vergleich zum Wildtyp, und darin, dass die Hyphen der *LaeA*-Defizitmutante insbesondere zu Beginn vermehrt apikal wachsen. Daher kann bei *A. nidulans* nicht ausgeschlossen werden, dass der hier nahezu vollständig fehlende Einfluss der Sekundärmetabolit-Defizitmutante nicht ausschließlich durch fehlende Sekundärmetabolite zustande kam, sondern auch das veränderte Wachstum einen Beitrag dazu leistete.

Die *LaeA*-Defizitmutanten von *A. fumigatus* und *A. flavus* unterschieden sich hingegen in ihrem Habitus weitgehend nicht von ihren Wildtypen. Sie waren darüber hinaus im Gegensatz zu *A. nidulans-ΔlaeA* auch in der Lage (dies gilt insbesondere für *A. flavus*), eine bis zu 100% betragende Mortalität hervorzurufen. Diese war dabei im Vergleich zum Wildtyp, zeitlich deutlich verzögert. Warum die *LaeA*-Defizitmutanten von *A. fumigatus* und *A. flavus* trotz verminderter Sekundärmetaboliten-Produktion eine dennoch hohe Mortalität unter den *D. melanogaster*-Larven hervorrufen können, bleibt hier unklar. Möglicherweise unterliegen nicht alle Sekundärmetabolite und somit Mykotoxine in diesen Arten dem globalen Regulator-Molekül *LaeA*, wie für *A. fumigatus* und auch andere Pilze bekannt ist (PERRIN et al. 2007, KOSALCOVÁ et al. 2009). Oder *A. fumigatus* und *A. flavus* sind in der Lage, die Regulation von *LaeA*, evtl. über Signale die durch die Anwesenheit oder das Verhalten der *D. melanogaster* Larven ausgelöst werden, zu umgehen. Nach dem hypothetischen Model von TSITSIGIANNIS und KELLER (2007; siehe auch Kapitel 6.3.2 Abschnitt *Oxylipine* und Abb. 6-11) können Schimmelpilze über *Oxylipine*, die von anderen Organismen synthetisiert wurden, äußere Einflüsse wahrnehmen und sie als Signale in das Zellinnere weiter leiten. Hier könnte als Reaktion auf die Schädigung durch die Larven ein weiterer, nicht über *LaeA* verlaufender Regulationsweg der Sekundärmetaboliten-Synthese aktiviert werden. Es wäre jedoch auch möglich, dass es sich bei einer solchen Reaktion um eine Selbsterkennung der verletzten Hyphen handelt, wie HEIL (2009) es für Verletzungen von Herbivoren bei Pflanzen vorgeschlagen hat. Zur Überprüfung dieser Vermutungen, müssten weitere Untersuchungen wie Genexpressionsexperimente in konfrontierten und nicht konfrontierten Schimmelpilzen folgen.

Gleiche Muster in der Überlebenswahrscheinlichkeit der Fliegenlarven wie die *LaeA*-Defizitmutanten zeigten auch die Konfrontationen mit der velvet-Mutante von *A. nidulans*. Da die beiden von der Genmanipulation betroffenen Proteine einen gemeinsamen Komplex zur Regulation von Genen bilden und somit eine verminderte Sekundärmetaboliten-Synthese durch die Mutation hervorgerufen wird, gliedert sich dieses Ergebnis in die Ergebnisse der Konfrontationen mit $\Delta laeA$ -Mutanten ein. Eine reduzierte Sekundärmetaboliten-Synthese der Schimmelpilze führt in der Konfrontation mit *D. melanogaster* zu einer gesteigerten Überlebenswahrscheinlichkeit der Larven. Dass trotz der Mutation ein vergleichsweise hoher Anteil der Larven die Konfrontation nicht überlebt, kann auf weitere Regulationswege der Mykotoxin-Produktion hinweisen, zumal die Synthese in den velvet-Mutanten nicht vollständig ausgeschaltet ist (BAYRAM et al. 2008).

Die Regulation über den Velvet-Komplex ist lichtabhängig (BAYRAM et al. 2008). Weitere Untersuchungen mit variierenden Lichtintensitäten und verschiedenen Tag-/Nachtrhythmen könnten Aufschluss über den Einfluss des Lichtes auf die Produktion von Sekundärmetaboliten bzw. den Einfluss auf das Überleben konkurrierender Insekten geben. Darüber hinaus stellt sich aus ökologischer Sicht die Frage, ob es sich hierbei um eine Anpassung an überwiegend nachtaktive Antagonisten handelt. Hierbei könnte während des Tages die potenziell kostenintensive Produktion von Sekundärmetaboliten reduziert sein, da sie zu diesem Zeitpunkt weniger von Nutzen ist. Während der Nacht hingegen, bei gesteigerter Aktivität von antagonistischen Individuen, führt eine vermehrte Produktion zu einer effizienteren Verteidigung. Somit kann es sich bei dieser Regulation um eine Funktion der Ressourcen-Schonung handeln. Diese Hypothese muss jedoch weiter untersucht werden.

Die Unterbrechung der Signalwege über die *Oxylipine* durch Mutationen, führte ebenso zu einer Steigerung der Mortalität unter den Larven. Ausgenommen hiervon ist die Tripel-Mutante (*ppoABC*), die das höchste Überleben der Larven in der Konfrontation zuließ. Überraschend ist, dass die Überlebenswahrscheinlichkeit nicht kongruent mit den synthetisierten Mengen an Ste-

rigmatocystin verläuft. Sowohl die Tripel- als auch die Doppel-Mutante (*ppoAC*), synthetisieren unter konfrontationsfreien Bedingungen kein Sterigmatocystin (TSITSIGIANNIS & KELLER 2006, 2007), jedoch trat nur bei der Tripel-Mutante eine reduzierte Mortalität auf. Desweiteren synthetisiert die Mutante *ppoA* zunächst weniger, nach 8 Stunden jedoch die gleiche Menge an Sterigmatocystin wie der Wildtyp, verursacht aber bei *D. melanogaster*-Larven eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Mortalität. Zu den Erwartungen passt jedoch wiederum, dass die höchste gemessene Mortalität durch die Überexpressionsmutante OE*ppoA* hervorgerufen wurde.

Eine Unterbrechung von Oxylipin-Signalwegen in Pflanzen führt zu einer vermehrten Schädigung durch Herbivore (KESSLER et al. 2004). Der Einfluss von Antagonisten auf die Fitness der Oxylipin-Mutanten wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, jedoch konnte gezeigt werden, dass die Oxylipine einen Einfluss auf die Interaktion zwischen Insekten und Schimmelpilzen haben. Ob sie auch wie in Pflanzen als Signalmoleküle zu Reaktionen in benachbarten Pilzkolonien führen, könnte über weitere Experimente mit einzelnen konfrontierten Kolonien und anschließender Genexpression oder Messung des Toxin-Gehalts in benachbarten Kolonien und dem umgebenden Substrat ermittelt werden.

Der nicht mit den Oxylipin-Mutanten, jedoch mit den *LaeA*-Defizitmutanten getestete Einfluss der *D. melanogaster*-Larven auf die Pilzfitness zeigt erneut die Bedeutung der Sekundärmetabolite als Funktion der Verteidigung der Schimmelpilze. Die reduzierte Fähigkeit Sekundärmetabolite zu synthetisieren reduziert in Anwesenheit von *D. melanogaster*-Larven zugleich das Wachstum und somit die Fitness der Schimmelpilze. Dies gilt insbesondere für *A. nidulans* und *A. flavus*. Bei *A. fumigatus* hingegen fehlte ein Unterschied im Wachstum zwischen konfrontierten Wildtyp-Kolonien und der Sekundärmetabolit-Defizitmutante. Beide Linien wurden stark in ihrem Wachstum durch die Larven unterdrückt. Dies kann mit dem zu Beginn des Wachstums dieser Art verzögerten Entwicklung zusammen hängen. Während eines Wachstums mit einer solchen geringen Intensität konnten die Larven das Pilzwachstum weitgehend unterdrücken. Dennoch führten beide Linien von *A. fumigatus* im Verlauf einer Konfrontation zu einer relativ hohen Mortalität unter den Insektenlarven.

Treten Larven von *D. melanogaster* in höheren Dichten auf, so sind sie in der Lage das Wachstum von Schimmelpilzen erheblich zu unterdrücken (ROHLFS 2005b). Durch die Unterdrückung des Wachstums und die Reduktion der pilzlichen Biomasse wird die Menge an möglichen toxischen Substanzen, die vom Pilz synthetisiert werden können, verringert (CALVO et al. 2002). Eine gemeinschaftliche Unterdrückung des toxischen Antagonisten wäre somit sinnvoll. Ob dies die Ursache für das Verhalten der Larven ist, sich um eine Pilzkolonie herum zu aggregieren anstatt Bereiche zu bevorzugen, die weiter entfernt vom Schimmelpilz sind und so den Kontakt mit toxischen Stoffen zu vermeiden, ist offen. Da die Larven von *Drosophila* auf die Aufnahme von bestimmten Substanzen angewiesen sind, die sie nicht selbst synthetisieren können, z.B. Sterine (DOBZHANSKY et al. 1956), und diese Nährstoffe über Mikroorganismen aufnehmen, könnten die Schimmelpilze allgemein als mikrobielle Aktivität wahrgenommen werden und so ein nährstoffreiches Substrat vermitteln, welches attraktiv für die Larven ist.

Bei der Unterdrückung des Pilzwachstums nehmen die Larven auch Bestandteile der Pilzkolonie, wie z.B. Konidien und Hyphen-Fragmente, auf. Dies kann durch Einfärbung des Darmes durch die nahezu durchsichtige Larve beobachtet werden. Auch hier ist unklar, ob sie dies zielgerichtet oder unbeabsichtigt tun. Die Spitzen der Hyphe, Ort erhöhter metabolischer Aktivität, enthalten zahlreiche Proteine, Aminosäuren und weitere energiereiche Bestandteile, die potenziell dem Wachstum der Larven förderlich sind. Jedoch geht die Aufnahme der Hyphen für die Larven mit der Aufnahme von Toxinen einher, die eine gegenteilige Auswirkung haben.

Trotz der Aufnahme von Pilzbestandteilen kann in der Interaktion von *D. melanogaster* und Schimmelpilzen jedoch nicht von einer Prädation ausgegangen werden, da die Fliegenlarven nicht abhängig vom Verzehr der Pilze sind und sich in späteren Entwicklungsstadien im Substrat vergraben und dadurch keinen direkten Kontakt zu den überwiegend an der Substratoberfläche wachsenden Pilzen mehr haben. Vielmehr handelt es sich bei den Interaktionspartnern um Konkurrenten, die gemeinsam dieselben Ressourcen nutzen und sich gegenseitig negativ beeinflussen.

Die äußeren, jungen Hyphen der Schimmelpilze werden u.a. durch die Bewegungen der Larven zerstört. Ob die Larven über weitere Mittel verfügen, das Wachstum zu unterdrücken, ist nicht bekannt. Einige der von *Drosophila*-Larven produzierten antimikrobiellen Peptide (AMPs) werden durch Kontakt mit Mikroorganismen induziert exprimiert, u.a. auch in Organen, in denen sie sonst nicht vorkommen. Ob AMPs, wie das Drosomycin, welches in den Speicheldrüsen sowohl konstitutiv als auch induziert exprimiert wird (TZOU et al. 2000), nach außen abgegeben werden, und dort das Pilzwachstum hemmen, ist nicht bekannt. Das AMP Cecropin beispielsweise ist in der Lage, das Pilzwachstum auch außerhalb des Insektenkörpers zu unterdrücken und dies schon in Konzentrationen, die weit unter denen liegen, die in der Hämolymphe erreicht werden (DELUCCA et al. 1997). Hierbei zeigte sich *A. fumigatus* als sensitivster der getesteten Pilze. *A. flavus* hingegen wies die höchste Resistenz auf (die Auswirkungen von Cecropin auf *A. nidulans* wurde in dieser Studie nicht getestet). Darüber hinaus befinden sich bei *A. flavus* auf der Oberfläche der Konidien bislang nicht näher definierte Substanzen, die eine Protease-Aktivität aufwiesen, welche die Wirkung des Cecropins hemmen können (DELUCCA et al. 1997).

Die hier verwendeten Schimmelpilzarten unterscheiden sich u.a. in ihrer Zusammensetzung an Sekundärmetaboliten, die in ihrer Struktur mitunter stark voneinander divergieren. Die Konfrontation der *D. melanogaster*-Larven mit diesen Arten führte zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten Mortalität unter den Fliegenlarven. Diese differenzielle Sensitivität gegenüber verschiedenen Mykotoxinen kann durch unterschiedlich häufige Konfrontationen mit diesen Stoffen in den natürlichen Fliegenpopulationen zustande gekommen sein, sodass eine regelmäßige Exposition mit bestimmten Substanzen in den Fliegen zur Entwicklung von Resistenz/Toleranz geführt hat. Dies zeigt sich z.B. auch in der unterschiedlichen Sensitivität verschiedener, aus unterschiedlichen geografischen Regionen stammenden *D. melanogaster* Linien, in Bezug auf die Resistenz gegenüber Aflatoxin (LEWELLYN & CHINNICI 1978, CHINNICI & MELONE 1985). Einzelne Individuen innerhalb einer Population können sich genetisch in bestimmten Fähigkeiten, wie z.B. der Konkurrenz gegenüber antagonistischen Schimmelpilzen, unterscheiden (ROHLFS 2006), wie Experimente mit Nachkommen einzelner Weibchen gezeigt haben.

Ob *D. melanogaster*, aus einer lokalen Population stammend, über die genetische Variation verfügt, solche Resistenzen durch kontinuierlich wiederkehrende Konfrontation mit pilzlichen Antagonisten zu entwickeln und ob es weitere korrelierte Antworten gibt, kann in einem Selektionsexperiment untersucht werden (siehe Kapitel 7).

7. Experimentelle Evolution – Selektion in *Drosophila* Populationen

Eigenschaften und Merkmale, die heute in Organismen beobachtet werden können, sind durch evolutive Vorgänge in der Vergangenheit entstanden. Wie sie sich gegenseitig beeinflussen oder in ihrer Entwicklung zusammenhängen, kann u.U. schwer beurteilt werden. Selektionsexperimente stellen eine wichtige Methode dar, Anpassungen an spezifische Fitness beeinflussende Umweltparameter und ihre korrelierten Antworten auf gerichtete Selektionen und potenzielle Zusammenhänge zwischen verschiedenen Eigenschaften, wie z.B. *trade-offs* (negativ korrelierte Eigenschaften, bei Verstärkung des einen Merkmals wird ein anderes geschwächt), aufzudecken (BURKE & ROSE 2009). Zu beachten ist, dass die Bedingungen im Labor hierbei eine künstliche Umwelt darstellen, die in natürlichen Habitaten gewöhnlich nicht in identischer Weise vorgefunden werden. Hierzu zählt u.a. eine gleichbleibende Qualität und Quantität an Nahrung und das Fehlen weiterer selektiver Drücke, die durch das experimentelle Design und der Routine der Haltung ausgeschlossen werden. Unter diesen künstlichen Bedingungen können sich im Laufe von Generationen Eigenschaften in den Laborpopulationen akkumulieren, respektive verloren gehen, welche unter Freilandbedingungen einen Fitnessnachteil bedeuten würden und daher nicht vermehrt aufträten. Die Verwendung von kürzlich aus der Natur entnommenen Individuen zur Etablierung einer Laborpopulation birgt hingegen das Risiko, dass neben den Veränderungen durch die künstliche gerichtete Selektion gleichzeitig Anpassungen an die neuen Bedingungen im Labor stattfinden. Hier können neben den Modifikationen durch einen künstlich induzierten Selektionsdruck weitere Veränderungen beobachtet werden, die auf nicht zutreffende Zusammenhänge schließen lassen (SERVICE & ROSE 1985). Das Ausmaß dieser Beeinflussung hängt dabei stark vom beobachteten Merkmal ab. Daher ist es ratsam, für Selektionsexperimente Laborpopulationen zu verwenden, die sich bereits über mehrere Generationen an die Bedingungen im Labor anpassen konnten. Allgemein ist zu bedenken, dass die Ergebnisse einer künstlichen Selektion sich nicht 1:1 auf die in der Natur ablaufenden Prozesse projizieren lassen, da dort vielfältige weitere Faktoren einen Einfluss ausüben. Nichtsdestotrotz können sie Einblick in evolutive Mechanismen ökologischer Phänomene bieten und prinzipielle Zusammenhänge aufdecken und entwirren.

Die Larven von *D. melanogaster* werden durch die Anwesenheit von giftigen Schimmelpilzen, mit denen sie in natürlichen Habitaten gemeinsam vorkommen können, negativ in ihren Fitnesseigenschaften beeinflusst. Am eindrucksvollsten zeigt sich dies in einer z.T. stark erhöhten Mortalität (siehe Kapitel 5 und 6). Eine derartig negative Beeinflussung sollte einen starken Selektionsdruck darstellen, was zu einer Begünstigung von solchen Varianten führen kann, die sich den insektiziden Eigenschaften der Pilze widersetzen können. Ein solcher Anpassungsprozess in den Insektenpopulationen wiederum kann in den antagonistischen Pilzen in Folge einer Koevolution zu Gegenanpassungen führen, z.B. in Form von neuen Mykotoxinen, die aufgrund anderer Strukturen und Wirkungsweisen eine erhöhte Toxizität aufweisen. Einem konstanten weiteren Aufschaukeln dieser Mechanismen stehen jedoch mögliche Kosten auf sowohl der pilzlichen wie auch der Insektenseite entgegen, die aufgrund der Aufrechterhaltung eines Verteidigungssystems bzw. dessen Anwendung zustande kommen (KRAAIJEVELD et al. 2002). Energie oder andere Ressourcen, die zur Aufrechterhaltung einer bestimmten Eigenschaft benötigt werden, stehen möglicherweise dann nur in eingeschränktem Maße für andere fitnessrelevante Eigenschaften zur Verfügung. Daher kann es ebenso von Vorteil sein, bestimmte Eigenschaften nicht zu besitzen, wenn diese nicht gebraucht werden und Kosten für deren Träger verursachen.

Das Zusammentreffen von *Drosophila*-Larven und konkurrierenden Schimmelpilzen ist stark von zeitlicher und räumlicher Variation geprägt, womit der Erhalt, aber auch der Verlust kostenverursachender Resistenzen/Toleranzen innerhalb einer Population in einem natürlichen System einen Vorteil bieten kann (KRAAIJEVELD et al. 1998). Möglicherweise spiegelt sich diese in der genetisch fixierten Variation bezüglich der Überlebenswahrscheinlichkeit einzelner mit Schimmelpilzen konfrontierter Individuen wider (ROHLFS 2006). Diese genetische Varianz sollte im folgenden Selektionsexperiment genutzt werden, um in Subpopulationen eine mögliche gesteigerte Resistenz/Toleranz gegenüber einem konkurrierenden Schimmelpilz zu erzeugen und die mögliche Rolle von Mykotoxinen aufzudecken.

In einer früheren Arbeit (WÖLFLE et al. 2009) wurden die evolutionären Kosten eines gesteigerten Entwicklungserfolges der Insekten in der Anwesenheit von Schimmelpilzen analysiert. Basierend darauf sollte in einer Weiterführung der Einfluss der Evolution einer verstärkten Resistenz/Toleranz auf die Fähigkeit der Larven parasitische Wespen im Rahmen einer zellulären Immunantwort abzuwehren, untersucht werden. Weiter sollte geklärt werden, welche Konsequenzen sich für das Wachstum der konkurrierenden Pilze ergeben, wenn sie mit Populationen konfrontiert werden, die einen höheren Anteil an resistenteren/toleranteren Individuen aufweisen. Da, wie in Kapitel 6 gezeigt, die *Drosophila*-Larven das Wachstum der Schimmelpilze massiv einschränken können, kann erwartet werden, dass Larven aus selektierten Populationen die Pilze stärker schädigen als Larven aus nicht selektierten Populationen, also solche, die empfindlicher gegenüber den insektiziden Eigenschaften der Pilze sind.

7.1. Das Selektionsexperiment

2006 wurden an verschiedenen Standorten in Kiel und Umgebung adulte Fliegen aus der Kieler Wildpopulation von *Drosophila melanogaster* gesammelt. Mit den gefangenen Fliegen wurden von Herrn Dr. Marko Rohlfs und Frau Dr. Christiana Anagnostou *Isofemalelines* etabliert, um in der F1 Generation präzise Artbestimmungen durchzuführen. 113 als *Drosophila melanogaster* identifizierte Linien wurden zur *Kiellinie* '06 zusammen geführt und seit dem unter Standardbedingungen kultiviert (siehe *Drosophila* Zucht Kapitel 4.3.1.).

Nach Eiablage aus der 29. Generation (November 2007) wurden die geschlüpften Fliegen in sechs gleich große Subpopulation separiert. Drei dieser Subpopulationen wurden einem Selektionsablauf folgend zyklisch während der Larvalphase mit Kolonien von *A. nidulans* konfrontiert. Diese Populationen werden im Folgenden mit A1, A2 bzw. A3 bezeichnet. Die drei verbleibenden Populationen dienten als Kontrollpopulationen, die sich während ihrer Larvalphase auf *A. nidulans* freiem Medium entwickeln konnten. Diese Populationen werden im Folgenden mit C1, C2 bzw. C3 bezeichnet.

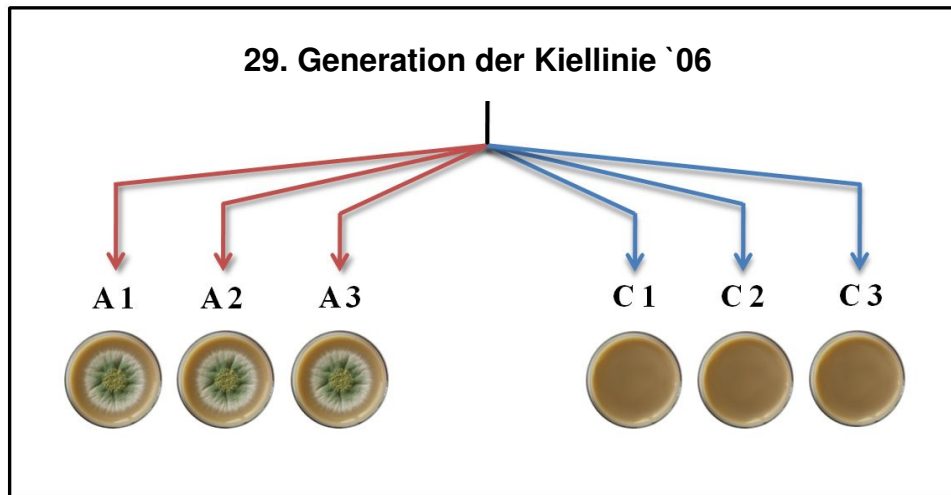


Abb. 7-1 Selektionsaufteilung

Fliegen aus der 29. Generation der Kiellinie `06 wurden in 6 gleich große Subpopulationen aufgeteilt, die im Folgenden unterschiedlich behandelt wurden. A-Populationen wurden zyklisch mit *A. nidulans* konfrontiert, C-Populationen dienten als nichtkonfrontierte Kontrollpopulationen.

Die ersten elf Generationen der Selektion wurden von Susanne Wölfle im Rahmen ihrer Diplomarbeit an der CAU in der Abteilung *Tierökologie* durchgeführt (WÖLFLE, 2008).

Nach einer zunächst stetigen Konfrontation der Populationen A1-A3 mit *A. nidulans* Kulturen, wurde nach der 3. Generation ein alternierender Ablauf weiterverfolgt (siehe Abb. 7-2). Hierbei fand die Konfrontation von jeweils 10 Larven in 2 mL Reaktionsgefäßen statt. In den Reaktionsgefäßen befand sich 1 mL Standardmedium (DZM), jedoch ohne Zugabe von Antibiotika oder Fungiziden. Versuchseinheiten, die für die selektierten Populationen A1-A3 vorgesehen waren, wurden 24 Stunden vor dem Transfer der Larven (L1 Stadium, steril) mit 1000 Konidien in 1 µL NaCl-Lösung von *A. nidulans* WT inokuliert. Die Versuchseinheiten der Kontrollpopulationen C1-C3 wurden durch Zugabe von 1 µL NaCl-Lösung gleich behandelt, jedoch ohne Konidien. Je Population wurden ca. 120 Reaktionsgefäße vorbereitet und bei 25°C und einem Tag-/Nachtrhythmus von 16/8 Stunden inkubiert. Geschlüpfte Fliegen wurden den Populationen entsprechend in Kästen umgesetzt. Nach etwa 4-7 Tagen wurde den Fliegen in den Populationskästen die Möglichkeit zur Eiablage gegeben. Die erhaltenen Eier wurden sterilisiert (siehe Dechorionisieren Kapitel 4) und zur weiteren Entwicklung in 165 mL Zuchtröhrchen auf ca. 30 mL Standardmedium (DZM) platziert. Diesem Medium wurden Antibiotika und Fungizide beigegeben (siehe Kapitel 4). Die geschlüpften Fliegen wurden wiederum in entsprechende Populationskästen entlassen.

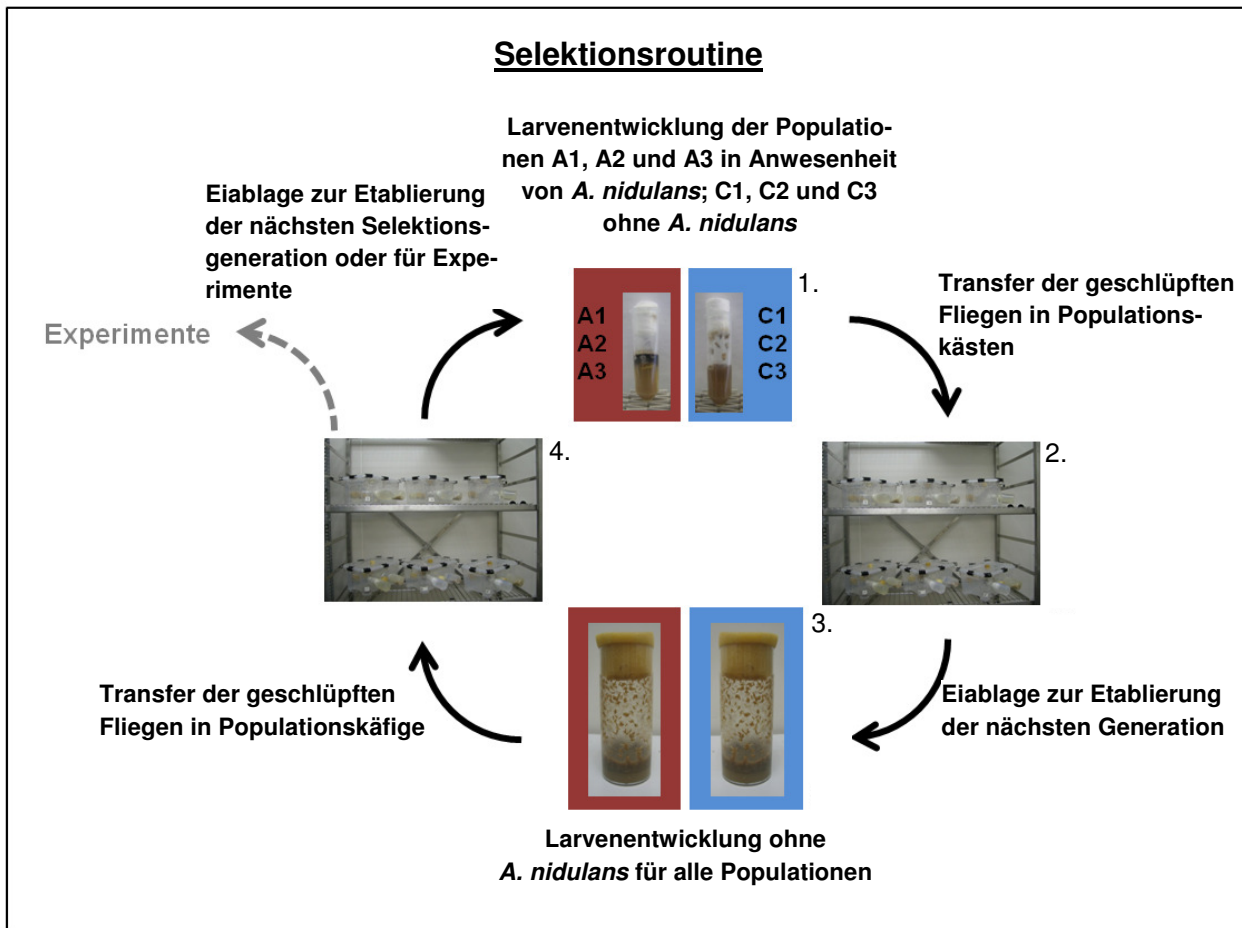


Abb. 7-2 Selektionsroutine

1.) Entwicklung von je 10 *D. melanogaster*-Larven pro 2 ml Reaktionsgefäß auf DZM mit *A. nidulans* (Population A1, A2 und A3) und ohne *A. nidulans* (Population C1, C2 und C3); 2.) Geschlüpfte Fliegen der jeweiligen Populationen werden in entsprechende Populationskäfige transferiert; 3.) Larven der Fliegen aus den Populationskäfigen werden zur Etablierung der konfrontationsfreien Generations genutzt; 4.) Geschlüpfte Fliegen werden in Populationskäfige entlassen. Larven dieser Generation werden zur Etablierung der nächsten Selektionsgeneration oder für Experimente verwendet.

Für den weiteren Verlauf der Selektion wurden Eier, die von diesen Fliegen abgelegt wurden, erneut für einen Selektionsschritt in 2 mL Reaktionsgefäßen verwendet. Ebenfalls von diesen Generationen wurden Eier für experimentelle Untersuchungen genommen, womit zwischen einem Selektionsschritt und einer experimentellen Untersuchung stets eine nicht konfrontierte Generation lag.

Nach der 11. Generation wurde die Selektion von mir zunächst mit einer Weiterführung des bestehenden Selektionsschemas für 3 Zyklen übernommen. Nach der 17. Generation wurde der selektive Druck durch Verwendung von Pilzkolonien die 48 Stunden vor dem Transfer der Larven inokuliert wurden erhöht. Dieses wurde für 2 Zyklen durchgeführt. Anschließend wurde der Druck erneut durch Verwendung von 72 Stunden alten *A. nidulans* Kolonien erhöht. Um Variationen in der Populationsgröße zwischen selektierten und nichtselektierten Fliegen zu vermeiden, wurde mit Beginn der Verwendung älteren Pilzkolonien die Anzahl der Reaktionsgefäße der Populationen A1-A3 auf jeweils 240 erhöht. Ab der 27. Generation wurden keine weiteren Selektionen durchgeführt, die Populationen jedoch weiterhin unter Nichtkonfrontations-Bedingungen aufrechterhalten.

Der gesamte Selektionsverlauf über alle Generationen ist in der Abbildung 7-3 dargestellt.

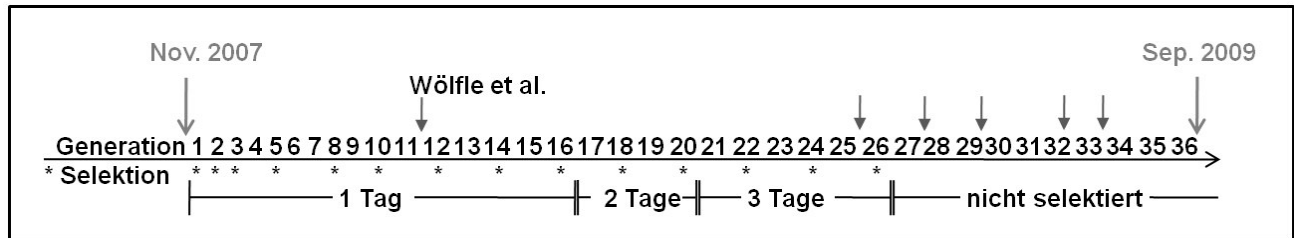


Abb. 7-3 Selektionsablauf

Den Generationen ist das Selektionsschema (*=selektiert) und der zeitliche Vorsprung von *A. nidulans* zugeordnet. Desweiteren sind die Zeitpunkte experimenteller Untersuchungen dargestellt.

7.2. Widerstandsfähigkeit gegenüber *A. nidulans* WT als direkte Antwort

Im Verlauf der Selektion wurden mehrere Generationen für Konfrontations-Experimente herangezogen, um zu untersuchen, ob sich die Fähigkeit der selektierten Fliegenlarven (A1-A3) in Anwesenheit von *A. nidulans* zu überleben, steigerte. In der Arbeit von Susanne Wölfle konnte bis zur 11. Generation nach Beginn der Selektion keine erhöhte Toleranz/Resistenz der Larven festgestellt werden (WÖLFLE et al. 2009). In dieser Arbeit sollte demnach der Einfluss des erhöhten Selektionsdruckes auf das Überleben der selektierten Populationen überprüft werden.

7.2.1. Konfrontation mit *A. nidulans* WT– Material und Methoden

Die Konfrontation der Selektionslinien nach der 25. Generation fand in 2 mL Reaktionsgefäßen statt. Pro Population wurden jeweils 20 Reaktionsgefäße 3 bzw. 2 Tage vor dem Transfer der Larven mit jeweils 1000 Konidien von *A. nidulans* inokuliert und bei 25°C vorinkubiert (Tag-/Nachtrhythmus 16/8 h). Zu den Kontrollgefäßen (20 pro Population) wurde jeweils 1 µL NaCl-Lösung gegeben und die Gefäße ebenfalls bei 25°C vorinkubiert. Je experimenteller Einheit wurden 10 sterile L1 Larven transferiert (Zusammenfassung siehe Box 7-1). 8 Tage nach dem Transfer begannen die ersten Adulttiere zu schlüpfen. Der Schlupf wurde täglich zur selben Zeit kontrolliert und geschlüpfte Tiere aus den Reaktionsgefäßen entfernt.

Nach der 27. Generation wurde der vorangegangene Versuch nach demselben Prinzip wiederholt, hierbei wurden Zeitvorsprünge des Schimmelpilzes von 1-3 Tagen gewählt (Zusammenfassung siehe Box 7-1).

Bei einer erneuten Wiederholung nach der 29. Generation wurde ein Entwicklungsvorsprung von 2 Tagen gewählt. Darüber hinaus wurden bei einem Vorsprung von 1-3 Tagen einzelne Larven separat mit dem Pilz konfrontiert (Zusammenfassung siehe Box 7-1).

Box 7-1 Experimenteller Aufbau zum Überleben von *D. melanogaster*-Larven selektierter und nicht selektierter Populationen bis zum Adultstadium konfrontiert mit *A. nidulans*

nach Generation	25.	27.	29.	29.
Pilzarten	<i>A. nidulans</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. nidulans</i>
Linie	WT	WT	WT	WT
Entwicklungsvorsprung [d]	2 und 3; Kontrolle	1, 2 und 3; Kontrolle	2; Kontrolle	1, 2 und 3; Kontrolle
Anzahl Larven pro Einheit	10	10	10	1
Replikate pro Population	20	20	20	20

7.2.2. Konfrontation mit *A. nidulans* WT – Ergebnisse

Nach Aufspaltung der Basispopulation in einzelne Subpopulationen gab es keine Unterschiede in der Überlebenswahrscheinlichkeit der Larven, wenn sie mit *A. nidulans* Kolonien konfrontiert wurden (WÖLFLE 2008). Nach den ersten 6 Selektionszyklen, die von Susanne Wölfle durchgeführt wurden, konnten keine Unterschiede in der Überlebenswahrscheinlichkeit der Larven gefunden werden. Unterschiede zeigten sich jedoch nach Konfrontation in erhöhtem Überleben adulter Fliegen und einer gesteigerten Eiablage bei den Weibchen der selektierten Populationen. Hingegen waren die Tiere aus den selektierten Populationen in ihrer Resistenz gegenüber abiotischen Stressfaktoren und Nahrungsmangel reduziert (WÖLFLE et al. 2009).

Die Konfrontationen mit *A. nidulans* Kolonien verschiedener Entwicklungsvorsprünge fanden nach unterschiedlichen aufeinanderfolgenden Generationen statt, um möglicherweise evolvierte Unterschiede in der Widerstandsfähigkeit der selektierten Populationen (A1-A3) und der nicht selektierten Kontroll-Populationen (C1-C3) gegenüber dem Schimmelpilz zu ermitteln.

Generation 25 - Larvenüberleben

Für die erste Untersuchung wurden von der 25. Generation abgelegte Eier bzw. die daraus geschlüpften Larven (L1) mit *A. nidulans* Kolonien konfrontiert, die einen zeitlichen Entwicklungsvorsprung von zwei und drei Tagen hatten. Bei Konfrontation mit zwei Tage vorinkubierten *A. nidulans* Kolonien überlebten mit einem Anteil von 0,71 rund 39% mehr Larven der selektierten Populationen (A1-A3) bis zum Adultstadium als Larven der nicht selektierten Populationen (C1-C3) (Abb. 7-4a). Bei drei Tagen Entwicklungsvorsprung des Pilzes reduzierte sich das Überleben selektierter und nicht selektierter Populationen weiter, mit einem um 7% geringeren Anteil geschlüpfter Fliegen in den selektierten Populationen. Statistisch signifikant war der Einfluss der Selektion, höchst signifikant der Einfluss des Alters des Pilzes und hoch signifikant der Einfluss der Interaktion zwischen Selektion und Pilzalter (vgl. Tab. 7-1).

Generation 27 - Larvenüberleben

Die zweite Überprüfung fand nach der 27. Generation statt. Hier fanden Pilzkolonien von *A. nidulans* mit einem Entwicklungsvorsprung von einem, zwei und drei Tagen Verwendung. Bei allen drei Zeitvorsprüngen resultierte die Konfrontation in einer höheren Überlebenswahrscheinlichkeit der Larven aus den selektierten Populationen (A1-A3) als der Larven aus den nicht selektierten Populationen (C1-C3) (Abb. 7-4b). Mit steigendem Alter des Pilzes reduzierte sich bei beiden Gruppen der Anteil geschlüpfter Fliegen, wobei der Unterschied zwischen selektierten und nicht selektierten bei einem Tag bei 12%, bei zwei Tagen bei 20% und bei drei Tagen bei 16% lag. Die statistische Analyse ergab prinzipiell vergleichbare Ergebnisse wie in dem vorangegangenen Experiment, mit einem signifikanten Einfluss der Selektion, einem höchst signifikanten Einfluss des Entwicklungsvorsprungs des Schimmelpilzes und einem hoch signifikanten Einfluss der Interaktion dieser beiden Faktoren (vgl. Tab. 7-1).

Generation 29 - Larvenüberleben

Eine dritte Konfrontation nach der 29. Generation wurde mit zwei Larvendichten durchgeführt. Bei einer Dichte von 10 hatte der Pilz einen Entwicklungsvorsprung von zwei Tagen (Abb. 7-4c). Zusätzlich wurden bei Entwicklungsvorsprüngen von einem, zwei und drei Tagen Larven einzeln mit dem Pilz konfrontiert (Abb. 7-4d) um den möglichen Einfluss eines Allee-Effektes zu überprüfen. Die Larven der selektierten Populationen (A1-A3) überlebten bei einer Larvendichte von 10 die Konfrontation mit *A. nidulans* mit einem Anteil von 0,77 um etwa 20% mehr

als die nicht selektierten Populationen (C1-C3). Der Einfluss der Selektion war hoch signifikant (vgl. Tab. 7-1).

In den Ansätzen der einzeln konfrontierten Larven ließ sich die in den vorangegangenen Experimenten beobachtete reduzierte Empfindlichkeit der selektierten Populationen nicht bestätigen (Abb. 7-4d). Die erhaltenen Werte für die selektierten und nicht selektierten Populationen lagen nah beieinander. Nur das Alter der Pilzkolonien hatte hier einen höchst signifikanten Einfluss auf das Überleben der Larven (vgl. Tab. 7-1).

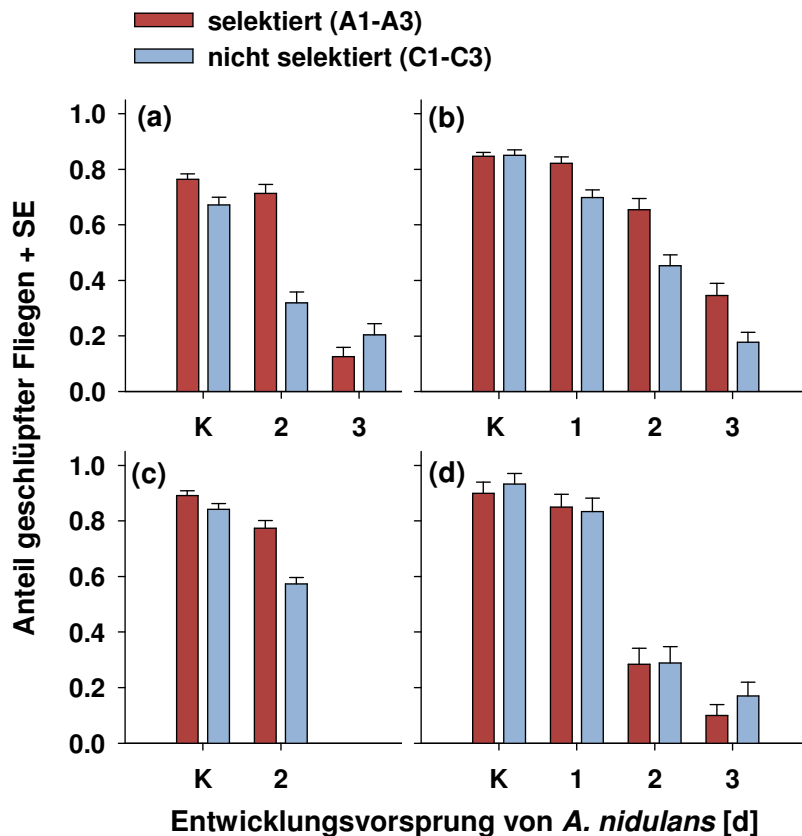


Abb. 7-4 Überleben von *D. melanogaster*-Larven selektierter und nicht selektierter Populationen bis zum Adultstadium konfrontiert mit *A. nidulans*

(a) nach der 25., (b) nach der 27. und (c) nach der 29. Generation bei einer Larvendichte von 10; (d) nach der 29. Generation bei einer Larvendichte von 1; dargestellt sind die mittleren Anteile der geschlüpften Fliegen der selektierten bzw. nicht selektierten Populationen + SE; n = 20 pro Population

Tab. 7-1 Statistik zum Überleben von *D. melanogaster*-Larven bis zum Adultstadium selektierter und nicht selektierter Populationen konfrontiert mit *A. nidulans* SAS 9.1 GLIMMIX; [Anzahl der Larven]

Generation	25 [10]		27 [10]		29 [10]		29 [1]	
	d.f.	F-Wert	d.f.	F-Wert	d.f.	F-Wert	d.f.	F-Wert
Selektion	1,4	15.80*	1,4	18.80*	1,4	30.94**	1,4	0.22
Alter	1,4	93.80***	1,4	93.80***	----	----	2,8	109.98***
Selektion x Alter	1,4	42.13**	1,4	42.13**	----	----	2,8	0.40

p < 0,05 = *; p < 0,01 = **; p < 0,001 = ***

Die Überlebenswahrscheinlichkeiten der Konfrontationen selektierter und nicht selektierter *Drosophila*-Populationen (A1-A3 und C1-C3) mit *A. nidulans* WT mit einem Entwicklungsvorsprung von zwei Tagen bei einer Larvendichte von 10 sind in der Abb. 7-5 zusammengefasst.

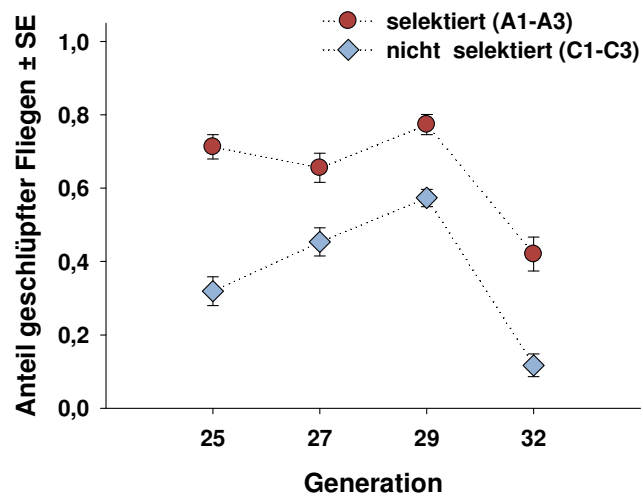


Abb. 7-5 Zusammenfassung zum Überleben selektierter und nicht selektierter *D. melanogaster* Populationen konfrontiert mit *A. nidulans* Kolonien (2 Tage Entwicklungsvorsprung) im Verlauf mehrerer Generationen

Generation 25 – Entwicklungszeit

Bei Konfrontation von Larven der 25. Generation mit zwei bzw. drei Tage vor Larventransfer inokulierten *A. nidulans* Kolonien lag die Entwicklungszeit der selektierten Populationen (A1-A3) unter der der nicht selektierten Populationen (C1-C3). Die nicht selektierten Populationen brauchten bei einem Entwicklungsvorsprung des Pilzes von zwei Tagen im Mittel 0,76 Tage, bei einem Entwicklungsvorsprung von drei Tagen im Mittel 0,81 Tage länger zur Entwicklung vom Ei bis zur geschlüpften Fliege als die selektierten (Abb. 7-6a). Der Einfluss des Selektionsregimes und der Einfluss des Alters der Pilzkolonien waren hierbei hoch signifikant (Tab. 7-2).

Generation 27 – Entwicklungszeit

Nach der 27. Generation nahmen die Entwicklungszeiten bei allen Populationen mit zunehmendem Entwicklungsvorsprung (ein Tag, zwei Tage, drei Tage) des Pilzes zu (Abb. 7-6b), jedoch gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den selektierten und den nicht selektierten Populationen. Das Alter des Pilzes hatte einen höchst signifikanten Effekt auf die Entwicklungszeit der Fliegenlarven (Tab. 7-2).

Generation 29 – Entwicklungszeit

Die Konfrontation nach der 29. Generation mit einer Larvendichte von 10 resultierte in einer nicht signifikant unterschiedlichen Entwicklungszeit für die selektierten Populationen (A1-A3) und nicht selektierten Populationen (C1-C3) (Abb. 7-6c, Tab. 7-2).

Bei der Larvendichte von 1 nach der 29. Generation unterschieden sich die Entwicklungszeiten von selektierten und nicht selektierten Populationen (C1-C3) ebenfalls nicht signifikant voneinander. Auch hier stieg die von den Larven selektierter und nicht selektierter Populationen benötigte Zeit, um sich vom Ei bis zur adulten Fliege zu entwickeln, mit dem Alter des Pilzes höchst signifikant an (Abb. 7-6d, Tab. 7-2).

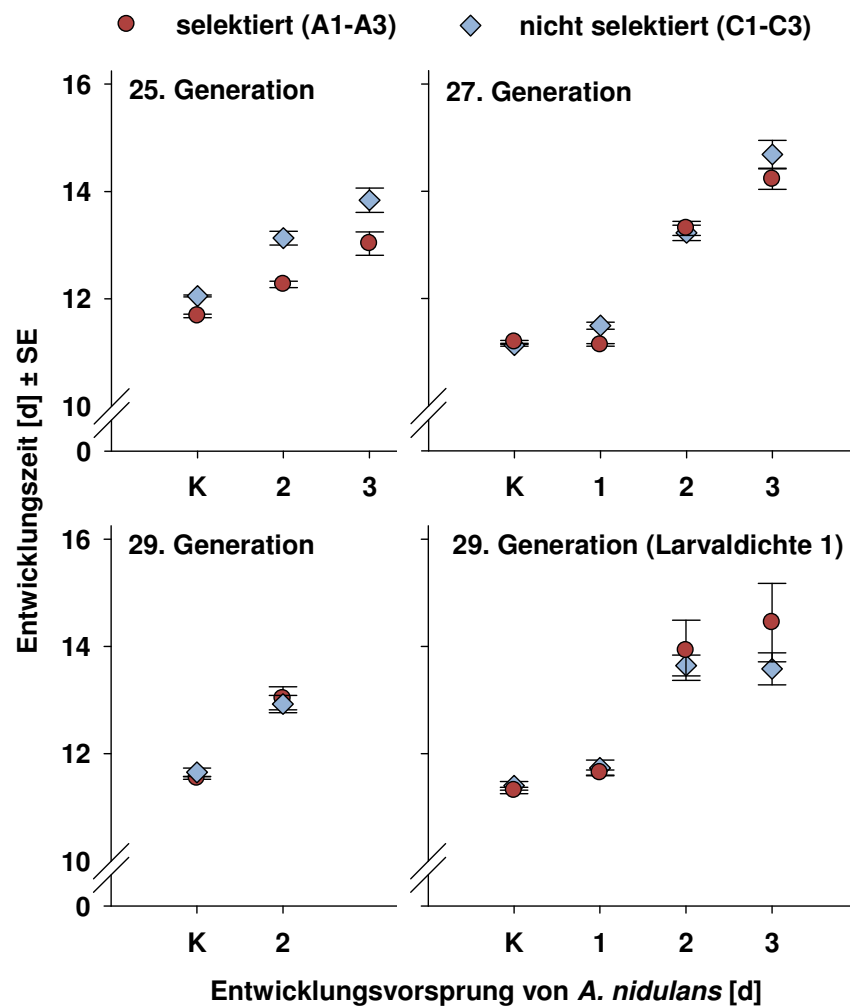


Abb. 7-6 Entwicklungszeit von *D. melanogaster*-Larven selektierter und nicht selektierter Populationen bis zum Adultstadium konfrontiert mit *A. nidulans*

Zeit nach der Eiablage [d] ± SE; (a) nach der 25., (b) nach der 27. und (c) nach der 29. Generation mit einer Larvendichte von 10; (d) nach der 29. Generation mit einer Larvendichte von 1; n = 20 pro Population

Tab. 7-2 Statistik zur Entwicklungszeit von *D. melanogaster*-Larven selektierter und nicht selektierter Populationen bis zum Adultstadium konfrontiert mit *A. nidulans* SAS 9.1 GLIMMIX; [Anzahl der Larven]

Generation	25 [10]		27 [10]		29 [10]		29 [1]	
	d.f.	F-Wert	d.f.	F-Wert	d.f.	F-Wert	d.f.	F-Wert
Selektion	1,4	21.89**	1,4	4.08	1,4	0.23	1,4	1.88
Alter	1,4	27.00**	2,8	228.87***	----	----	2,8	79.65***
Selektion x Alter	1,4	0.06	2,8	2.07	----	----	2,8	1.38

p < 0,05 = *; p < 0,01 = **; p < 0,001 = ***

7.3. Toxinresistenz als korrelierte Antwort

Die oben dokumentierte Evolution eines verbesserten Entwicklungserfolges von *Drosophila* in Anwesenheit von *A. nidulans* könnte mechanistisch durch eine gesteigerte Resistenz gegenüber den vom Schimmelpilz produzierten Mykotoxinen erklärt werden. Die Hypothese, dass ein höherer Entwicklungserfolg der Insektenlarven in der Konkurrenz mit *A. nidulans* positiv mit der Resistenz gegenüber dem wichtigsten Mykotoxin dieses Schimmelpilzes (Sterigmatocystin) korreliert, wurde im Folgenden überprüft. Eine korrelierte Antwort beschreibt hierbei eine Veränderung einer Eigenschaft (hier die Toxinresistenz) auf die nicht selektiert wurde, die einhergeht mit einer veränderten Eigenschaft (hier die Widerstandsfähigkeit gegenüber *A. nidulans*) auf die durch das angewendete Selektionsregime selektiert wurde. Dabei werden korrelierte Antworten (im Gegensatz zu direkten Antworten) ohne vorherige Konfrontation mit dem Selektionsdruckauslösenden Faktor gemessen.

7.3.1. Toxinresistenz in selektierten Populationen – Material und Methoden

Das Mykotoxin Sterigmatocystin (ST; Sigma-Aldrich) wurde in Aceton gelöst und bei -20°C gelagert. Vor Beginn des Experimentes wurden Konzentrationen von $1\ \mu\text{g}/10\ \mu\text{L}$ bzw. $2\ \mu\text{g}/10\ \mu\text{L}$ eingestellt. Um eine Verdunstung des Lösungsmittels und damit eine Konzentrationsveränderung während der Vorbereitung ST-kontaminierter Entwicklungssubstrate zu verhindern, wurden die ST-Lösungen ständig in einem Kühlblock aufbewahrt. Für jede Population wurden 10 Replikationen durchgeführt. Jedes Reaktionsgefäß war mit 1 mL DZM gefüllt. $10\ \mu\text{L}$ der entsprechenden Toxinlösung wurden auf die Oberfläche des Mediums appliziert und für die Dauer von 2 Stunden zum Abdampfen des Lösungsmittels unverschlossen in einer Sterilbank belassen. Den Kontrollen wurden $10\ \mu\text{L}$ Aceton hinzugegeben. Nach Ablauf der 2 Stunden wurden die Reaktionsgefäße mit einem Baumwollstopfen verschlossen und jeweils 10 sterile L1 Larven von der 29. Generation transferiert (Zusammenfassung siehe Box 7-2).

Box 7-2 Experimenteller Aufbau zur Toxinresistenz von *D. melanogaster*-Larven selektierter und nicht selektierter Populationen konfrontiert mit Sterigmatocystin nach der 29. Generation

Toxin	Sterigmatocystin
Konzentration	1 und 2 μg , Kontrolle
Anzahl Larven pro Einheit	10
Replikate pro Population	10

In gleicher Weise wie im vorangegangenen Experiment wurde mit den Mykotoxinen Aflatoxin (AF) und Ochratoxin (OC) verfahren. Jeweils 10 Replikate pro Population wurden angefertigt. Die Konzentrationen von $1\ \mu\text{g}/10\ \mu\text{L}$, $2\ \mu\text{g}/10\ \mu\text{L}$ bzw. $3\ \mu\text{g}/10\ \mu\text{L}$ wurden gewählt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurden die Reaktionsgefäße verschlossen und jeweils 10 sterile Larven von der 33. Generation eingesetzt (Zusammenfassung siehe Box 7-3).

Box 7-3 Experimenteller Aufbau zur Toxinresistenz von *D. melanogaster*-Larven selektierter und nicht selektierter Populationen konfrontiert mit Mykotoxinen nach der 33. Generation

Toxin	Sterigmatocystin, Aflatoxin und Ochratoxin
Konzentration	1, 2 und 3 μg , Kontrolle
Anzahl Larven pro Einheit	10
Replikate pro Population	10

7.3.2. Toxinresistenz in selektierten *Drosophila* Populationen – Ergebnisse

Sterigmatocystin – nach Generation 29

Die Zugabe von Sterigmatocystin in einer Konzentration von 1 μg /Reaktionsgefäß führte bei den nicht selektierten Populationen (C1-C3) zu einer Reduktion des Anteils geschlüpfter Fliegen im Vergleich zur giftfreien Kontrolle um ca. 0,09. Bei den selektierten Populationen (A1-A3) blieb der Anteil geschlüpfter Fliegen indes nahezu konstant (Abb. 7-7). Bei einer Zugabe von 2 μg Sterigmatocystin pro Reaktionsgefäß reduzierte sich bei allen Populationen der Anteil geschlüpfter Fliegen, jedoch bei den selektierten in einem um 36% geringeren Maße als bei den nicht selektierten Populationen. Das Selektionsregime und die Konzentration des Toxins hatte hierbei einen hoch bzw. höchst signifikanten Einfluss auf den Anteil überlebender Larven, genauso wie die statistische Interaktion zwischen den beiden Variablen (vgl. Tab. 7-3).

Die Entwicklungszeit stieg in allen Populationen mit der Toxinkonzentration höchst signifikant an. Einen Unterschied in der zur Entwicklung benötigten Zeit zwischen selektierten und nicht selektierten Populationen gab es hingegen nicht (Abb. 7-7, Tab. 7-3).

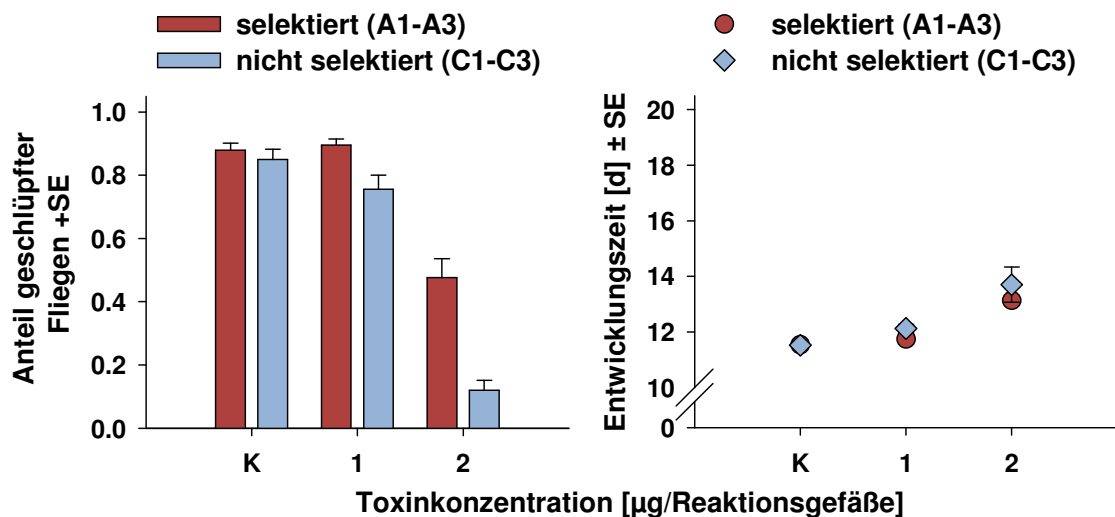


Abb. 7-7 Überleben von *D. melanogaster*-Larven bis zum Adultstadium und Entwicklungszeit von selektierten und nicht selektierten Populationen konfrontiert mit Sterigmatocystin

Anteil der sich bis zum Adultstadium entwickelten Larven bzw. deren Entwicklungszeit abhängig von der Toxinkonzentration + bzw. \pm SE; n = 10 pro Population

Tab. 7-3 Statistik zum Überleben von *D. melanogaster*-Larven bis zum Adultstadium und zur Entwicklungszeit selektierter und nicht selektierter Populationen konfrontiert mit Sterigmatocystin SAS 9.1 GLIMMIX

Sterigmatocystin <i>Faktor</i>	Überleben		Zeit	
	d.f.	F-Wert	d.f.	F-Wert
Selektion	1,4	28.34**	1,4	5.58
Konzentration	2,8	45.11***	1,4	47.81**
Selektion x Konzentration	2,8	4.97*	1,4	0.60

$p < 0,05 = *$; $p < 0,01 = **$; $p < 0,001 = ***$

Sterigmatocystin – nach Generation 33

Die nach der 33. Generation mit Sterigmatocystin (ST) konfrontierten Larven zeigten bei einer Toxinkonzentration von 1 µg/Reaktionsgefäß eine leichte Reduktion im Anteil geschlüpfter Fliegen. Hierbei lag der Wert der nicht selektierten Populationen (C1-C3) um 0,06 unter dem der selektierten Populationen (A1-A3) (Abb. 7-8). Bei einer Verdopplung der Toxinkonzentration auf 2 µg/Reaktionsgefäß erhöhte sich die Mortalität bei allen Populationen um ein Vielfaches. Auch hier lag die Überlebenswahrscheinlichkeit der Larven aus den selektierten Populationen über der der nicht selektierten Populationen (Anteil von 0,15). Durch eine weitere Erhöhung der Konzentration auf 3 µg/Reaktionsgefäß reduzierte sich der Anteil überlebender Larven noch einmal auf 0,17 bei den selektierten Populationen und lag somit um 0,15 über den der nicht selektierten. Das Selektionsregime hatte hier einen marginal nicht signifikanten Effekt (vgl. Tab. 7-4). Der Einfluss der Konzentration auf das Überleben der Larven war höchst signifikant und der Einfluss der Interaktion Selektion x Konzentration signifikant (vgl. Tab. 7-4).

Mit zunehmender Toxinkonzentration stieg die Entwicklungszeit der Larven an. Hierbei lag die Entwicklungszeit der nicht selektierten Populationen um 0,31 Tage [1µg], 1,96 Tage [2µg] bzw. 0,79 Tage über der der selektierten Populationen (Abb. 7-8). Die statistische Auswertung ergab einen hoch signifikanten Einfluss der Selektion, einen höchst signifikanten Einfluss der Konzentration und einen signifikanten Einfluss der Interaktion von Selektion x Konzentration auf die Entwicklungszeit der *D. melanogaster*-Larven konfrontiert mit Sterigmatocystin (vgl. Tab 7-4).

Aflatoxin – nach Generation 33

Aflatoxin (AF) verursachte im Vergleich zu Sterigmatocystin bereits bei geringerer Konzentration eine höhere Mortalität. Der Anteil lebender Larven ging bei 1 µg AF/Reaktionsgefäß auf einen Anteil von 0,24 bei den selektierten Populationen (A1-A3) zurück und lag dabei nur um 0,02 über dem der nicht selektierten (C1-C3) (Abb. 7-8). Bei 2 µg AF reduzierte sich der Anteil geschlüpfter Fliegen erneut auf 0,07 bzw. $<0,01$ für die selektierten bzw. nicht selektierten Populationen. 3 µg AF/Reaktionsgefäß führte zu einer 100%igen Mortalität in den nicht selektierten Populationen. Ein Anteil von $<0,01$ der Larven aus den selektierten Populationen konnten sich bis zum Adulttier entwickeln. Die Anteile überlebender Larven der selektierten Populationen, die über denen der nicht selektierten Populationen lagen, wurden von der Selektion dennoch nicht signifikant beeinflusst (vgl. Tab. 7-4). Die Konzentration hingegen hatte einen höchst signifikanten und auch die Interaktion von Selektion und Konzentration einen signifikanten Einfluss auf das Überleben der Larven (vgl. Tab. 7-4).

Ebenso wie beim Sterigmatocystin stieg beim Aflatoxin die Entwicklungszeit mit steigender Toxinkonzentration (Abb. 7-8). Die selektierten Populationen (A1-A3) benötigten 0,2 bzw.

0,43 Tage (1 bzw. 2 μg AF/Reaktionsgefäß) weniger zur Entwicklung vom Ei bis zur adulten Fliege als die nicht selektierten Populationen (C1-C3). Die Entwicklungszeit bei 3 μg AF verlängerte sich bei den selektierten Populationen auf 15,0 Tage. Bei den nicht selektierten Populationen konnten sich keine Larven bis zur Fliege entwickeln. Außer der Konzentration des Toxins mit einem höchst signifikanten Einfluss hatte keiner der anderen Terme statistisch signifikante Auswirkungen auf die Entwicklungszeit (vgl. 7-4).

Ochratoxin

Der Einfluss von Ochratoxin (OC) auf das Überleben der Larven war weitaus geringer als bei den beiden anderen verwendeten Toxinen (Abb. 7-8). Auch bei der in diesem experimentellen Ansatz verwendeten höchsten Konzentration verringerte sich der Anteil überlebender Larven nur geringfügig. Die Werte der selektierten und nicht selektierten Populationen waren dabei in etwa gleich. Hier hatte nur die Konzentration des Ochratoxins einen hoch signifikanten Einfluss auf das Überleben der Larven (Tab. 7-4).

Wie auch bei den anderen Mykotoxinen nahm die Entwicklungszeit mit steigender Konzentration zu. Das Selektionsregime hatte hierbei keinen signifikanten Einfluss, jedoch, wie schon bei den anderen Toxinen, hatte die Konzentration einen höchst signifikanten Einfluss auf die Entwicklungszeit. Der Einfluss der Interaktion von Selektion x Konzentration auf die Entwicklungszeit der Larven war signifikant (vgl. Tab 7-4).

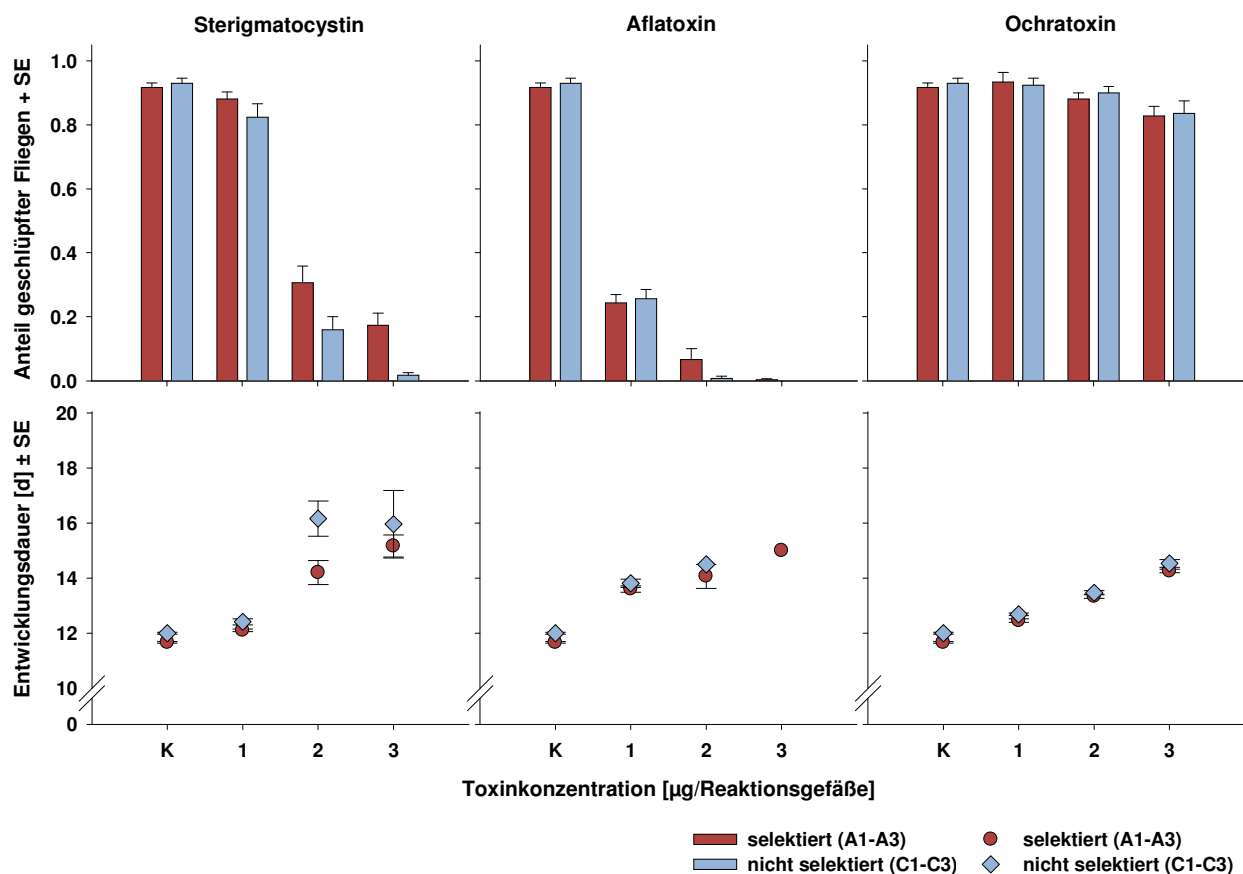


Abb. 7-8 Überleben von *D. melanogaster*-Larven bis zum Adultstadium und Entwicklungszeit selektierter und nicht selektierter Populationen konfrontiert mit Sterigmatocystin, Aflatoxin und Ochratoxin.

Anteil der sich bis zum Adultstadium entwickelten Larven bzw. deren Entwicklungszeit abhängig von der Toxinkonzentration + bzw. \pm SE; Der Standardfehler ist in den Diagrammen der Entwicklungszeit aufgrund extrem geringer Variation z.T. nicht/schlecht erkennbar; n = 10 pro Population

Tab. 7-4 Statistik zum Überleben von *D. melanogaster*-Larven bis zum Adultstadium und zur Entwicklungszeit selektierter und nicht selektierter Populationen konfrontiert mit Sterigmatocystin, Aflatoxin oder Ochratoxin SAS 9.1 GLIMMIX

Überleben	ST		AF		OC	
	d.f.	F-Wert	d.f.	F-Wert	d.f.	F-Wert
Selektion	1,4	7.16	1,4	5.71	1,4	0.49
Konzentration (Konz.)	3,12	126.12***	2,8	227.60***	3,12	7.33**
Selektion x Konz.	3,12	5.29*	2,8	4.99*	3,12	0.11

Zeit	ST		AF		OC	
	d.f.	F-Wert	d.f.	F-Wert	d.f.	F-Wert
Selektion	1,4	21.93**	1,4	2.45	1,4	10.02*
Konzentration (Konz.)	3,11	90.14***	3,6	131.74***	3,12	495.38***
Selektion x Konz.	3,11	4.89*	2,6	0.23	3,12	0.78

p < 0,05 = *; p < 0,01 = **; p < 0,001 = ***; ST= Sterigmatocystin; AF= Aflatoxin; OC=Ochratoxin

7.4. Widerstandsfähigkeit gegenüber weiteren *Aspergilli* als korrelierte Antwort

Ebenso wie die Untersuchung von Resistenzen/Toleranzen gegenüber Mykotoxinen, sollte die Konfrontation mit anderen Schimmelpilzen als dem zur Ausübung des Selektionsdruckes verwendeten zeigen, ob Veränderungen in der Zusammensetzung der Populationen sich spezifisch auf *A. nidulans* gerichtet entwickelt haben, oder ob artenunabhängige Mechanismen zu unterschiedlichen Überlebenswahrscheinlichkeiten selektierter und nicht selektierter Subpopulationen geführt haben. Auch wären *trade-offs* im Überleben der Larven durch Spezialisierung auf *A. nidulans* in der Konfrontation mit *A. fumigatus* und *A. flavus* denkbar.

7.4.1. Konfrontation mit weiteren *Aspergilli* – Material und Methode

Für die Ermittlung von potenziell evolvierten gesteigerten Überlebenswahrscheinlichkeiten wurden die selektierten und nichtselektierten Populationen mit Pilzkolonien von *A. fumigatus* und *A. flavus* konfrontiert. Hierbei wurden variierende Entwicklungsvorsprünge der einzelnen Arten gewählt, die den Ergebnissen der Konfrontation der Experimente aus Kapitel 5 und 6 angepasst waren. Die Behandlung mit den Pilzen sollte eine deutliche Mortalität unter den *Drosophila*-Larven hervorrufen, jedoch nicht zu einem 100%igen Absterben der Insekten führen. Parallel wurde eine weitere Konfrontation mit *A. nidulans* durchgeführt. Die Konfrontation fand in 2 mL Reaktionsgefäßen mit jeweils 1 mL DZM und einer Pilzkolonie ausgehend von 1000 Konidien statt. Die Konidien von *A. nidulans* wurden 2 Tage und die von *A. fumigatus* 1 Tag vor bzw. die von *A. flavus* am selben Tag des Larventransfers inokuliert. Den Kontrollen wurde je 1 µL konidienfreier NaCl-Lösung hinzugegeben. Die Inkubation fand bei 25°C und einem Tag-/Nachtrhythmus von 12/12 Stunden statt (Zusammenfassung siehe Box 7-4).

Box 7-4 Experimenteller Aufbau zur Widerstandsfähigkeit von *D. melanogaster*-Larven selektierter und nicht selektierter Populationen konfrontiert mit *Aspergillus* ssp. nach der 32. Generation

Pilzarten	<i>A. nidulans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i>
Linie	WT
Entwicklungsvorsprung [d]	2 <i>A. nidulans</i> 1 <i>A. fumigatus</i> 0 <i>A. flavus</i> ; Kontrolle
Anzahl Larven pro Einheit	10
Replikate pro Population	10

7.4.2. Konfrontation mit weiteren Aspergilli – Ergebnisse

In der Konfrontation mit *A. nidulans* WT zeigte sich auch nach der 32. Generation eine erhöhte Überlebenswahrscheinlichkeit der selektierten Populationen gegenüber den nicht selektierten Populationen um einen Anteil von ca. 0,3 (Abb. 7-9). Die Unterschiede zwischen den Anteilen der geschlüpften Fliegen in den Konfrontationen mit *A. fumigatus* und *A. flavus* fielen hingegen geringer aus. Auch hier überleben die selektierten Larven in einem höheren Maße. Das globale Modell ergab einen signifikanten Einfluss der Selektion und der Interaktion zwischen Selektion und Schimmelpilzart auf das Überleben der Larven (Tab. 7-5). Um zu überprüfen, ob bei allen konfrontierten Pilzarten (*A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. flavus*) ein signifikanter Unterschied im Überleben der Larven selektierter und nicht selektierter Linien bestand, wurden Posthoc-Tests durchgeführt. Diese ergaben, dass nur bei *A. nidulans* ein signifikanter Unterschied bestand im Überleben selektierter und nicht selektierter Larven (Tab. 7-6).

Die Entwicklungszeit unterschied sich nur in geringem Maße zwischen den selektierten und nicht selektierten Populationen (Abb. 7-9). Hierbei benötigten die nicht selektierten Populationen 0,75 Tage (*A. nidulans*), 0,1 (*A. fumigatus*) und 0,42 Tage (*A. flavus*) länger als die selektierten. Die artspezifischen Unterschiede in der Entwicklungszeit, waren weitaus größer. Trotz der geringen Unterschiede war der Einfluss des Selektionsregimes signifikant sowie der Einfluss der Identität des Pilzes (Art) höchst signifikant auf die Entwicklungszeit der Larven (vgl. Tab 7-5).

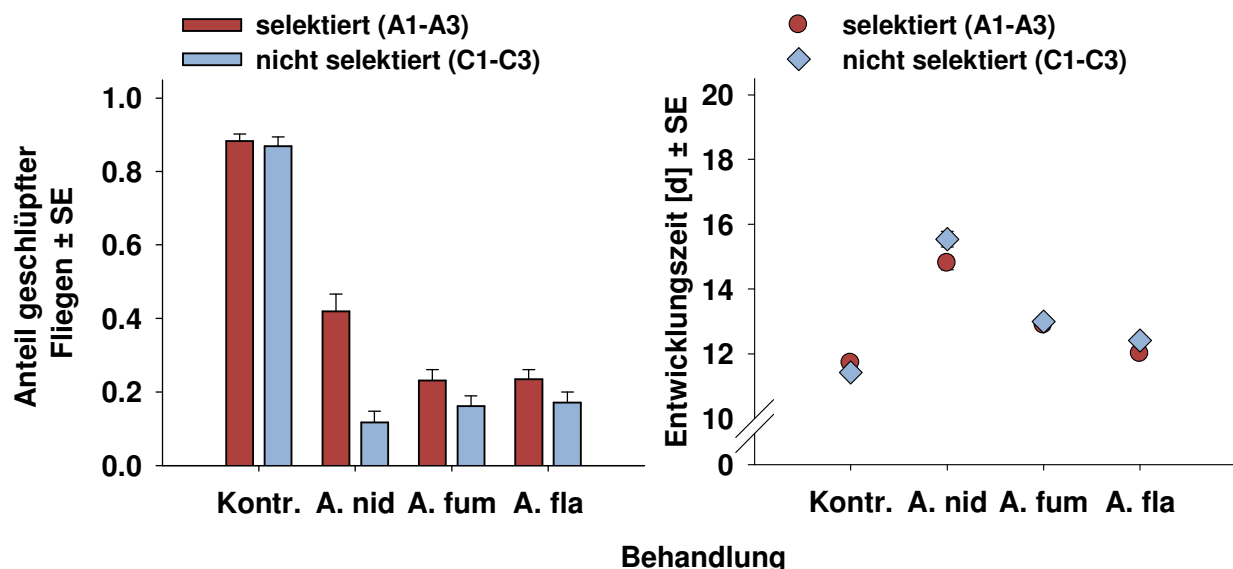


Abb. 7-9 Überleben von *D. melanogaster*-Larven bis zum Adultstadium und Entwicklungszeit der selektierten und nicht selektierter Populationen konfrontiert mit *A. nidulans*, *A. fumigatus* und *A. flavus*
Anteil der geschlüpften Fliegen bzw. deren Entwicklungszeit nach Arten + bzw. ± SE; n = 20 pro Population

Tab. 7-5 Statistik zum Überleben von *D. melanogaster*-Larven bis zum Adultstadium und zur Entwicklungszeit der selektierten und nicht Populationen konfrontiert mit *A. nidulans*, *A. fumigatus* und *A. flavus* SAS 9.1 GLIMMIX

Faktor	Überleben		Zeit	
	d.f.	F-Wert	d.f.	F-Wert
Selektion	1,4	13.46*	1,4	15.11*
Art	2,8	1.71	2,8	246.14***
Selektion x Art	2,8	5.01*	2,8	2.21

p < 0,05 = *; p < 0,01 = **; p < 0,001 = ***

Tab. 7-6 Statistik zum Überleben von *D. melanogaster*-Larven bis zum Adultstadium der selektierten und nicht Populationen konfrontiert mit *A. nidulans*, *A. fumigatus* oder *A. flavus* SAS 9.1 GLIMMIX post hoc

	d.f.	F
<i>A. nidulans</i>	1,4	30.49**
<i>A. fumigatus</i>	1,4	2.25
<i>A. flavus</i>	1,4	0.80

p < 0,01 = **

7.5. Parasitoidenresistenz als korrelierte Antwort

Im Folgenden sollte überprüft werden, inwieweit die Fähigkeit von *D. melanogaster* Eier der Brackwespe *Asobara tabida* einkapseln und somit den Parasitoiden abtöten zu können, durch die Selektion auf eine erhöhte Resistenz/Toleranz gegenüber einem Schimmelpilz beeinflusst wurde.

7.5.1. Parasitoidenresistenz selektierter *Drosophila* Populationen – Material und Methode

Die Eier der selektierten und nicht selektierten *D. melanogaster* Populationen wurden wie in Kapitel 4.1.1. beschrieben sterilisiert und anders als im Protokoll beschrieben in Petrischalen (Ø 55 mm) auf Zuchtmedium (DZM) zum Schlupf gelegt. Das Medium enthielt die doppelte Menge an Agar-Agar (25 g/L) um das Eingraben der Larven im Medium zu vermindern. Je Population wurden 10 *Asobara tabida* Weibchen zu den Larven gesetzt und ihnen ca. 5 Stunden Zeit zur Parasitierung gegeben. Nach Ablauf der Zeit wurden die Larven in Gruppen von 10 Individuen in 2 ml Reaktionsgefäße mit je 1 ml DZM transferiert. Nach 6 bzw. 7 Tagen wurden die Puppen sezirt und die Anzahl an eingekapselten Eiern bzw. geschlüpften *A. tabida* Larven dokumentiert (Zusammenfassung siehe Box 7-5).

Box 7-5 Experimenteller Aufbau zur Parasitoidenresistenz von *D. melanogaster*-Larven der selektierten und nicht selektierten Populationen gegen *Asobara tabida* nach der 27. Generation

Parasitoid	<i>Asobara tabida</i>
Parasitierung	ca. 5 h
Sektion	6 und 7 Tage nach Parasitierung
Anzahl Larven pro Einheit	10
Replikate pro Population	30

7.5.2. Parasitoidenresistenz selektierter *Drosophila* Populationen – Ergebnisse

Die Anteile der erfolgreich eingekapselten *A. tabida* Eier, abhängig von den insgesamt gefundenen Parasitierungen (Eikapseln und Parasitoidenlarven), lag bei den Selektierten Populationen im Mittel bei 0,49 und unterschieden sich damit nur geringfügig und nicht signifikant von denen der nicht selektierten Populationen (0,46) (Abb. 7-10).

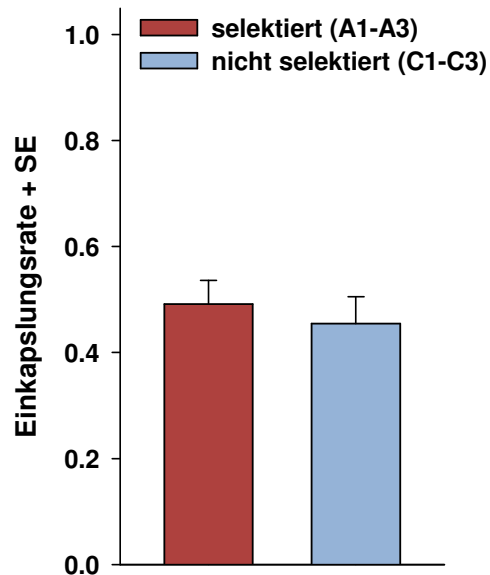


Abb. 7-10 Anteil eingekapselter Eier des Parasitoiden *A. tabida* bei selektierten und nicht selektierten *D. melanogaster* Populationen
 $F_{1,4} = 0,91$; $p = 0,3953$ SAS 9.1 GLIMMIX $n = 30$ pro Population

7.6. Beeinflussung des Pilzwachstums durch selektierte *Drosophila* Populationen

Die Evolution einer Resistenz sollte nach der Definition von RÅBERG (2009) nicht nur eine gesteigerte Fitness des Trägers der Resistenz vermittelnden Eigenschaft mit sich bringen, sondern darüber hinaus auch zu einer Benachteiligung der Fitness des Antagonisten führen. Als Maß für die Fitness des Schimmelpilzes wurde das Wachstum durch Messung der von der Schimmelpilzkolonie bedeckten Substratoberfläche ermittelt. Die Larven von *D. melanogaster* sind in der Lage insbesondere in größeren Gruppen das Pilzwachstum zu unterdrücken (siehe Kapitel 6.2.2). Ob Larven aus selektierten Populationen im Vergleich zu solchen aus nicht selektierten Populationen stärker das Wachstum der Pilze unterdrücken, sollte hier untersucht werden.

7.6.1. Beeinflussung des Pilzwachstums – Material und Methode

Zur Überprüfung ob bei den selektierten Populationen eine gesteigerte Resistenz, also eine verringerte Fitness des Pilzes, vorliegt, wurden *A. nidulans* Kolonien mit einem Entwicklungsvorsprung von 48 Stunden, was dem Zeitvorsprung mit einer gesteigerten Überlebenswahrscheinlichkeit von *D. melanogaster* entspricht (siehe Kapitel 7.2), in 2 mL Reaktionsgefäßen mit jeweils 10 Larven konfrontiert. Zusätzlich wurden zu den 60 konfrontierten Kolonien 60 unabhängige Kontrollen durchgeführt. Die Konfrontation fand unter 25°C und einem Tag-/Nachtzyklus von 16/8 Stunden statt (Zusammenfassung siehe Box 7-6). Die fotografische Dokumentation wurde in einem Intervall von 6 Stunden durchgeführt, beginnend 6 Stunden nach dem Larventransfer. Dokumentiert wurde für die Dauer von 72 Stunden. Die Bilder wurden an-

schließlich mit *ImageJ* (1.41o, National Institutes of Health, USA) ausgewertet und die relative Konkurrenzintensität (RKI = (Behandlung – Kontrolle)/Kontrolle; siehe Kapitel 6.2.1) in Form der relativen Kolonieoberfläche berechnet.

Box 7-6 Experimenteller Aufbau zur Pilzfitness von *A. nidulans* konfrontiert mit *D. melanogaster*-Larven der selektierten und nicht selektierten Populationen

Pilzarten	<i>A. nidulans</i>
Linie	WT
Entwicklungsvorsprung	48 h
Anzahl Larven pro Einheit	10
Replikate	10

7.6.2. Beeinflussung des Pilzwachstums – Ergebnisse

Bereits 6 Stunden nach der Konfrontation mit jeweils 10 sterilen L1 Larven wurde eine Reduktion des Pilzwachstums relativ zur Kontrolle, gemessen in der Koloniefäche, festgestellt (Abb. 7-11). Die relative Konkurrenz Intensität (RKI) lag im Mittel bei -0,30 für die selektierten Populationen und bei -0,33 bei den nicht selektierten Populationen. Nach einer geringfügigen Erhöhung des negativen Einflusses der Larven auf das Pilzwachstum 12 bzw. 18 Stunden nach Beginn der Konfrontation, verringerte sich der Unterschied zwischen konfrontierten und nicht konfrontierten Pilzkolonien. Nach 54 Stunden unterschieden sich die konfrontierten Pilzkolonien nicht mehr von den Kontrollkolonien. Der Verlauf des gemessenen Pilzwachstums der Kolonien, die mit Larven aus den selektierten Populationen konfrontiert wurden, lag parallel zu dem mit nicht selektierten Larven konfrontierten Pilzkolonien. Hierbei lagen die RKI-Werte, die durch nicht selektierte Larven hervorgerufen wurden, leicht unter denen der selektierten Larven. Statistisch unterschieden sich die beiden Behandlungen jedoch nicht voneinander (siehe Abb. 7-11).

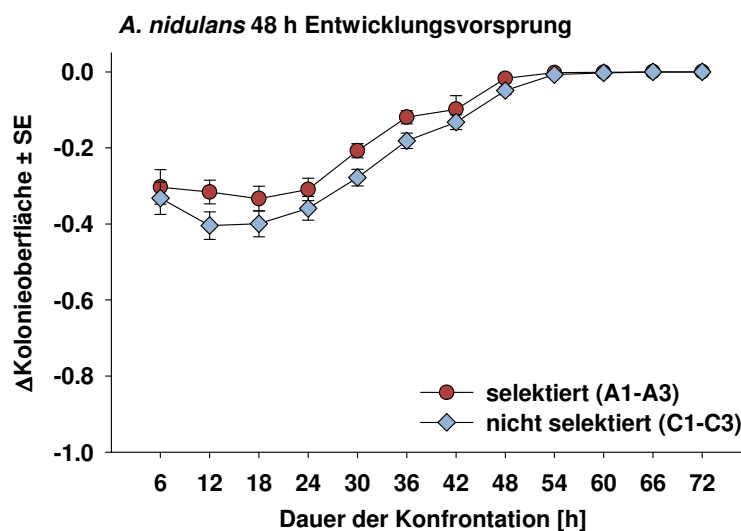


Abb. 7-11 Pilzwachstum von *A. nidulans* konfrontiert mit selektierten und nicht selektierten *Drosophila*-Larven

Relative Wachstumsverläufe in Form von delta-Werte von konkurrierender und nicht konkurrierender Pilzkolonien konfrontiert mit selektierten und nicht selektierten *D. melanogaster*-Larven, berechnet als relative Konkurrenzintensität (siehe Kapitel 6.2.1); n=10; Selektion: $F_{1,4}=0.36$; $p=0,5804$; MIXED Prozedur SAS 9.1 wiederholter Messungen

7.7. Experimentelle Evolution – Diskussion

Die genetische Variation einer Resistenz/Toleranz innerhalb einer natürlichen Population kann durch räumlich und zeitlich variierende Exposition zu Antagonisten und damit verbundenen Kosten der Aufrechterhaltung dieser Resistenz/Toleranz erhalten bleiben (KRAAIJEVELD & GODFRAY 1997, LAZZARO et al. 2004, TINSLEY et al. 2006). Diese Unterschiede können in genetischen Polymorphismen (unterschiedliche Ausprägung eines Gens/Allel), durch vererbare unterschiedliche Expression von „Resistenz-Genen“ oder durch Vervielfältigung einzelner beteiligter Gene im Genom begründet liegen. Die genetische Variation zwischen verschiedenen Populationen verschiedener Standorte können hierbei Hinweis auf eine lokale Anpassung sein (KRAAIJEVELD & VAN ALPHEN 1995, DUPAS et al. 2003, TINSLEY et al. 2006).

Bei der Interaktion zwischen *Drosophila* und Schimmelpilzen handelt es sich um in Raum und Zeit unvorhersehbare Konfrontationen. Kommt es zu vermehrtem Auftreten von Schimmelpilzen, können sich diejenigen Individuen einer *Drosophila*-Population vermehrt reproduzieren, relativ zu den anderen Individuen derselben Population, die durch ihre Kombination an Eigenschaften die potenziell negativen Einflüsse der Schimmelpilze besser bewältigen können. Im Falle der Interaktion von *Drosophila* und Schimmelpilzen, kann diese Kombination an Eigenschaften u.a. auf effektiven Detoxifizierungs-Mechanismen beruhen, falls eine chemische Abwehr in Form bestimmter Mykotoxine seitens der Pilze ursächlich ist für den variierenden Entwicklungserfolg der konkurrierenden Insektenlarven auf mit Schimmel befallenen Fraßsubstraten. Folglich würde ein kontinuierlicher Selektionsdruck durch konkurrierende, Mykotoxin-produzierende Schimmelpilze zu einer Steigerung der Häufigkeit widerstandsfähigerer Variationen innerhalb der betroffenen *Drosophila*-Populationen führen.

Die in den ersten Generationen fehlende direkte Antwort selektierter *D. melanogaster*-Linien in Form einer erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit der Larven in Anwesenheit des Schimmelpilzes (WÖLFLE et al. 2009), kann auf eine unzureichende Intensität des Selektionsdruckes aufgrund eines zu geringen Entwicklungsvorsprungs der Pilze zurückzuführen sein. Da der Kontakt zwischen *Drosophila* und Schimmelpilzen überwiegend während der Larvalphase stattfindet, war in dieser Phase eine Veränderung der Widerstandsfähigkeit zu vermuten. Schimmelpilze mit einem Entwicklungsvorsprung von 24 Stunden führten möglicherweise jedoch nicht zu einer ausreichend negativen Beeinflussung der Larven, wodurch sich auch weniger widerstandsfähige Individuen zur adulten Fliege entwickeln, reproduzieren und damit ihre Eigenschaften an die nächste Generation weitergeben konnten. Aus diesem Grund konnte sich im Verlauf der Generationen der Anteil an widerstandsfähigeren Individuen in den Populationen nicht signifikant erhöhen. Dennoch konnte während der ersten Generationen eine gesteigerte Überlebensdauer geschlüpfter Fliegen aus den selektierten Populationen als Indikator eines evolvierten Schutzes gegenüber dem Pilzkonkurrenten beobachtet werden (WÖLFLE et al. 2009). Auch in der auf eine gesteigerte Aflatoxin-Resistenz gerichteten Selektion, wurden bei mildem Selektionsdruck (geringe Aflatoxin-Konzentration) keine Unterschiede zwischen selektierten und nicht selektierten Populationen erhalten (MELONE & CHINNICI 1986). MELONE und CHINNICI konnten nach einer Weiterführung der Selektion mit einer gesteigerten Aflatoxin-Konzentration eine erhöhte Resistenz feststellen. Ebenso konnte in der in dieser Arbeit durchgeführten Selektion eine Erhöhung der Widerstandsfähigkeit von *Drosophila*-Larven gegenüber dem antagonistischen Schimmelpilz *A. nidulans* erst nach Steigerung des Selektionsdruckes (durch verlängerten Entwicklungsvorsprung des Schimmelpilzes) beobachtet werden. Dies gilt insbesondere für Larven die in Gruppen von 10 Individuen gemeinsam mit dem Schimmelpilz konfrontiert wurden, jedoch nicht für einzeln konfrontierte Larven.

Dies gibt Anlass zur Vermutung, dass sich Veränderungen im Gruppenverhalten der selektierten Populationen relativ zu nicht selektierten Populationen etabliert haben könnten, die das Pilzwachstum und somit den negativen Einfluss des Schimmelpilzes stärker unterdrücken. Eine verstärkte Aggregation um die Schimmelpilzkolonien oder ein längere Verweildauer der Larven auf der Oberfläche des Mediums, und somit ein verzögertes Unterbleiben des direkten Kontaktes und damit der Schädigung der Pilzhyphen, könnten ursächlich sein. Verstärkte negative Einflüsse der Larven selektierter Populationen waren allerdings nicht zu beobachten. Die Anwesenheit der Larven wirkte sich zwar negativ auf das Wachstum der Schimmelpilze aus, jedoch gab es keinen Unterschied zwischen dem Einfluss der Tiere aus den selektierten und nicht selektierten Populationen. Demzufolge müssen noch andere, bislang unbekannte dichteabhängige Faktoren eine Rolle in der Evolution eines Schutzes gegenüber konkurrierenden Schimmelpilzen bei *Drosophila* spielen.

Größere Gruppen von *Drosophila*-Larven sind in der Lage das Pilzwachstum zu unterdrücken (ROHLFS et al. 2005) und so möglicherweise den negativen Einfluss der Schimmelpilze zu verringern (WERTHEIM et al. 2002). Über die Art und Weise, wie sie dies tun, ob allein durch Bioturbation, durch aktives Zerstören der Hyphen mit ihren Mundhaken, durch Aufnahme von Pilzsubstanz als zusätzliche mikrobielle Nahrung oder durch Abgabe antifungaler Substanzen, kann hier nur spekuliert werden. Da ein gesteigerter Selektionsdruck in Form eines höheren Entwicklungsvorsprungs des Pilzes zwar zu einer gesteigerten Überlebensfähigkeit der selektierten Populationen führte, jedoch zwischen selektierten und nicht selektierten Populationen kein Unterschied im Einfluss auf das Pilzwachstum bestand, sollte hier laut Definition nicht von einer gesteigerten *Resistenz* selektierter *Drosophila*-Populationen, sondern von einer gesteigerten *Toleranz* ausgegangen werden (RÅBERG et al. 2009).

Nach den ersten sechs Selektionszyklen zeigten sich korrelierte Antworten (z.B. Reduktion der Hungerresistenz adulter Fliegen), die auf Kosten in Form einer reduzierten Fitness hinweisen. Diese Reduktion bestimmter Eigenschaften zu Gunsten anderer *life history traits* (Eigenschaften der Lebensgeschichte eines Individuums), z.B. einer gesteigerten Fekundität selektierter *D. melanogaster*-Populationen gegenüber nicht selektierten nach einer Konfrontation mit dem Schimmelpilz (WÖLFLE et al. 2009), zeigen Grenzen der Etablierung von spezifischen Eigenschaften auf. Oder anders formuliert, für die Begünstigung einer unter bestimmten Bedingungen vorteilhaften Eigenschaft, muss potenziell an anderer Stelle „bezahlt“ werden. Die gesteigerte Toleranz gegenüber dem Schimmelpilz blieb zumindest für sechs Generationen nach dem letzten Selektionsschritt in einem weithin konstanten Ausmaß erhalten. Die Variation zwischen den einzelnen Experimenten ist auffällig, jedoch überleben die selektierten Populationen fast gleichbleibend mit einer im Mittel zwischen 20 und 30% höher liegenden Wahrscheinlichkeit als die nicht selektierten Populationen.

In natürlichen Populationen kann sich der Anteil toleranterer Individuen durch Ausbleiben von Konfrontationsereignissen wieder reduzieren, wenn für die erhöhte Toleranz fitnessrelevante Kosten zu tragen sind und diese den Nutzen übersteigen. Diese Reduktion in der Toleranz der selektierten Populationen konnte unter den vorherrschenden Laborbedingungen und im Rahmen der abgelaufenen Zeit (Generationen) nicht beobachtet werden.

Einhergehend mit gesteigerter Toleranz gegenüber *A. nidulans* etablierte sich als korrelierte Antwort auf den Selektionsdruck des Schimmelpilzes eine hoch signifikant gesteigerte Resistenz gegenüber dem Mykotoxin Sterigmatocystin. Nach der letzten Untersuchung verringerte sich jedoch die höhere Überlebenswahrscheinlichkeit der selektierten Populationen auf einen marginal nicht signifikanten Wert. Durch den beträchtlichen Arbeits- und Zeitaufwand der Selektionsprozedur, konnte mit drei selektierten und drei nicht selektierten Populationen nur eine ver-

gleichsweise geringe Anzahl an Replikaten (insgesamt sechs) durchgeführt werden. Aufgrund dieser geringen Replikanzahl wirken sich Variationen innerhalb der replizierten Populationen stark auf das Ergebnis der statistischen Auswertung aus. Somit lässt sich trotz des nicht signifikanten Ergebnisses der zweiten Konfrontation mit Sterigmatocystin die Null-Hypothese nicht ablehnen, ohne möglicherweise einen beträchtlichen Irrtum (β -Fehler, fälschliche Nicht-Ablehnung der Nullhypothese) von $>90\%$ einzugehen. Durch die geringe Anzahl an Replikaten und durch die Varianz in den Ergebnissen, ist die Stärke (*power*) des durchgeführten Tests (glimmix von SAS 9.1) vergleichsweise gering ((FAUL et al. 2007), g-power: <http://www.psych.uni-duesseldorf.de/abteilungen/aap/gpower3/>; Stand Jan. 2010), deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Selektion zu einer gesteigerten und bis zur 33. Generation erhalten gebliebenen Resistenz gegenüber dem Mykotoxin geführt hat. Das nicht signifikante Ergebnis der zweiten Konfrontation mit Sterigmatocystin kann jedoch auch daraus resultieren, dass der Anteil resistenter Individuen in den selektierten Populationen im Begriff ist, sich wieder zu verringern, da zwischen der letzten Konfrontation mit *A. nidulans* und der Untersuchung auf Toxinresistenz sieben Generationen lagen.

Ähnliches gilt ebenso für das Aflatoxin, das aus dem Sterigmatocystin synthetisiert wird und diesem strukturell ähnelt. Analog zur zweiten Sterigmatocystin-Konfrontation bestand, mit einem etwas höheren p-Wert, kein signifikanter Unterschied im Überleben selektierter und nicht selektierter Larven bis zum Adultstadium in Anwesenheit von Aflatoxin. Eine erhöhte Resistenz gegenüber Aflatoxin als korrelative Antwort in *Drosophila*-Populationen durch wiederkehrende Konfrontation mit *A. nidulans*, kann jedoch durch die geringe Teststärke der statistischen Auswertung (wie oben beschrieben) nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Ein Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Resistenz gegenüber Sterigmatocystin und Aflatoxin ist aufgrund der ähnlichen Wirkungsweise beider Mykotoxine als Mutagen durch die Bildung von Addukten mit der DNA denkbar.

Für Veränderungen im Bereich der Immunantworten als mögliche korrelierte Antwort auf die gesteigerte Toleranz gegenüber dem Schimmelpilz, wurde beispielhaft die Resistenz gegenüber dem Parasitoiden *Asobara tabida* untersucht. Unterschiede in der Einkapselungsfähigkeit, die durch das Selektionsregime entstanden sein könnten, wurden nicht gefunden. Es ist somit zu vermuten, dass die Fähigkeit, Parasitoide abzuwehren, nicht von der gesteigerten Toleranz gegenüber dem Pilz beeinträchtigt wird.

Der gesteigerten Resistenz gegenüber dem Mykotoxin könnte eine gesteigerte oder effizientere Detoxifizierung zugrunde liegen, da diese eine Anpassung an in der Nahrung befindliche Toxine darstellt (BERENBAUM 2002). Eine gesteigerte Detoxifizierung kann auf einer höheren Expression oder einer größeren Anzahl an Kopien von Genen, die an der Detoxifizierung beteiligt sind, beruhen. Individuen der Basispopulation mit einer in dieser Weise vermittelten gesteigerten Detoxifizierung, könnten sich in den selektierten Populationen zu einem höheren Anteil reproduziert haben.

Durch Bioaktivierung können Stoffe, die u.U. bereits toxische Wirkung haben, zu Intermediärprodukten abgebaut werden, die eine höhere Toxizität als das Ausgangsmolekül aufweisen. Dies ist u.a. für Aflatoxin gezeigt, welches in das hoch reaktive AF_{B1}-8,9-exo-epoxid (AFBO) umgeformt werden kann (UENG et al. 1995). Bioaktivierungen ähnlicher Art wurden auch in *Drosophila* gefunden (SANER et al. 1996). Daher kann eine reduzierte Funktion bestimmter Abbauprozesse ebenso zu einem erhöhten Überleben mit Schimmelpilzen konfrontierter Fliegenlarven führen, d.h. auch Individuen der Basispopulation mit einer derart reduzierten Bioaktivierung könnten sich in den selektierten Populationen in höherem Maße reproduziert haben. Bedenkt man, dass Sterigmatocystin mit der DNA interagieren kann und mutagen wirkt (ESSIGMANN et

al. 1979), ist die Beteiligung von effizienteren DNA-Reparaturmechanismen eine weitere Möglichkeit.

Welche Art von Mechanismus der gesteigerten Überlebenswahrscheinlichkeit selektierter Populationen in der Konfrontation mit *A. nidulans* oder Sterigmatocystin unterliegt, und ob es eine Kombination verschiedener Mechanismen ist, bleibt zu untersuchen. Die erhöhte Resistenz gegenüber dem Mykotoxin, die als korrelative Antwort in den mit *A. nidulans* selektierten *Drosophila*-Populationen gefunden wurde, kann ein Mechanismus sein, der in der Konfrontation mit Mykotoxin-produzierenden Schimmelpilzen zu einem erhöhten Überleben führt. Ob es über den korrelativen Zusammenhang hinaus einen kausalen Zusammenhang gibt und ob neben diesem möglichen, noch weitere Mechanismen beteiligt sind, müssen zukünftige Untersuchungen aufdecken. In jedem Fall ist die entstandene Toleranz gegenüber *A. nidulans* spezifisch gegen diese Schimmelpilzart gerichtet, und gegen das von *A. nidulans* synthetisierte Mykotoxin Sterigmatocystin. Sie vermittelt keine generell gesteigerte Toleranz gegenüber Schimmelpilzen und/oder Mykotoxinen, zumindest nicht gegenüber *A. fumigatus* und *A. flavus*.

Ein interessanter experimenteller Ansatz wäre ein Selektionsexperiment, das parallel auf erhöhte Toleranz gegenüber einem Schimmelpilz und auf die Resistenz gegenüber Mykotoxinen selektiert. Hiermit ließe sich überprüfen, ob sich wechselseitig korrelierte Toleranzen/Resistenzen etablieren. Korrelierte Antworten können sich jedoch stark voneinander in wiederholten Experimenten unterscheiden (HARSHMAN & HOFFMANN 2000) und müssen nicht unbedingt in dieser parallelen Weise auftreten (SHIOTSUGU et al. 1997). Sollten derlei korrelierte Toleranzen/Resistenzen jedoch das Ergebnis eines solchen „Kreuz-Resistenz“-Experimentes sein, würden sie weitere Evidenz für die Mykotoxine als Schlüsselrolle in der Interaktion von *Drosophila* und Schimmelpilzen bieten.

Es konnte hier gezeigt werden, dass es vererbare Variabilität in Populationen von *D. melanogaster* gibt, sich erfolgreich in der Gegenwart von *A. nidulans* zu entwickeln und dass eine Verbesserung in dieser Eigenschaft mit Kosten in anderen fitnessrelevanten Eigenschaften einhergeht. Die zugrunde liegenden physiologischen oder molekulargenetischen Mechanismen bleiben jedoch hier offen und stehen somit zu nachfolgenden Untersuchungen aus.

8. Abschließende Diskussion und Perspektiven

Interspezifische Konkurrenz zwischen nahe verwandten Arten, welche ähnliche Ansprüche an ihr Habitat oder ihre Nahrung stellen, ist ein weithin bekanntes und beachtetes Phänomen. Konkurrenz zwischen phylogenetisch weit entfernten Arten aus z.B. verschiedenen Organismen-Reichen (*interkingdom competition*) ist hingegen weitaus weniger beachtet, obwohl es begründete Annahmen gibt, dass es sich dabei um ein häufiges Phänomen handelt (JANZEN 1977, BURKEPILE et al. 2006). Davon ausgehend, dass Organismen, die sich gegenseitig negativ beeinflussen, auf den jeweils anderen Antagonisten selektiv wirken können, kann angenommen werden, dass sich im Rahmen eines ko-evolutionären Prozesses Maßnahmen der Verteidigung oder Kompensation und Gegenmaßnahmen der Eliminierung dieser Verteidigung entwickeln. Die gegenseitige Beeinflussung in der Interaktion von Insekten (*Drosophila*) und Schimmelpilzen (*Aspergillus*) war Gegenstand dieser Arbeit. Hierbei lag das Hauptaugenmerk auf den Eigenschaften von *Drosophila*, die in ihrer Fitness durch Schimmelpilze stark beeinflusst werden kann (WERTHEIM et al. 2002, ROHLFS 2005b, a, 2006, ROHLFS & KÜRSCHNER 2009, WÖLFLE et al. 2009).

Drosophila und *Aspergillus* – ein evolutionsökologisches Modellsystem

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Bedeutung von Mykotoxinen in der Interaktion von Schimmelpilzen mit saprophagen Insekten sowie den adaptiven Wert der Mykotoxine für die Schimmelpilze zu analysieren. Hierfür kam ein neues evolutionsökologisches Modell, *Drosophila* als Stellvertreter für saprophage Insekten und Schimmelpilze der Gattung *Aspergillus* als Antagonisten, zum Einsatz. Ein bedeutender Vorteil der gewählten Arten liegt in den zahlreich zur Verfügung stehenden wissenschaftlichen Information (*ISI Web of knowledge* >58.000 Treffer zu *Drosophila melanogaster*; >22.000 Treffer zu *Aspergillus nidulans* OR *fumigatus* OR *flavus*; Stand Jan 2010), in deren Kontext erhaltene Ergebnisse betrachtet werden können. Darüber hinaus war die Verfügbarkeit von genetisch manipulierten Linien für Teile des hier gewählten experimentellen Ansatzes von großer Bedeutung.

Die Zusammensetzung der bakteriellen und pilzlichen Flora, mit der *Drosophila* im Detail unter Freilandbedingungen assoziiert ist, ist nicht bekannt (DOBZHANSKY et al. 1956, ATKINSON & SHORROCKS 1977, STARMER et al. 1988, OAKESHOTT et al. 1989). Daher kann nicht mit Gewissheit gesagt werden, ob *D. melanogaster* in natürlichen Habitaten mit den verwendeten *Aspergillen* konfrontiert ist. Da beide saprotrophen Organismen, *Drosophila* und die verwendeten Schimmelpilze, eine kosmopolitische Verbreitung aufweisen und verschiedenste Substrate zur Entwicklung nutzen können, sind regelmäßige Begegnungen ebenso wenig auszuschließen. Die verwendeten Schimmelpilze aus der Gattung *Aspergillus* dienen als Stellvertreter für Mykotoxin-produzierende Schimmelpilze und sollten so zur Aufklärung ihrer Rolle in der Interaktion mit *Drosophila* beitragen. Inwieweit das hier verwendete ökologische Modellsystem natürliche Wechselwirkungen zwischen saprophagen Insekten und Schimmelpilzen widerspiegelt, müsste Gegenstand intensiver Freilandstudien sein.

Obwohl *D. melanogaster*-Larven Bestandteile, Hyphen und Konidien von Schimmelpilzen aufnehmen, sei dies gezielt oder zufällig zusammen mit dem Substrat, kann bei der Interaktion dieser beiden Organismen nicht von einem Räuber-Beute-System oder speziell Pilz-Pilzfresser-System ausgegangen werden. Die Schimmelpilze wachsen auf der Oberfläche des Substrates, während die Larven sich in späteren Stadien im Substrat eingraben und keinen direkten Kontakt zu den Pilzen mehr haben. Desweiteren werden beide Organismen negativ durch den jeweils an-

deren beeinflusst (zweiseitig negative Interaktion). Daher ist vielmehr von einer Interaktion konkurrierender Organismen auszugehen, die gemeinsam dasselbe Substrat besiedeln und als Ressource nutzen. Klar abgrenzen lassen sich diese beiden Formen (Konkurrenz-System bzw. Prädations-System) der Interaktion zwischen *D. melanogaster* und Schimmelpilzen allerdings nicht.

Die Larven von *D. melanogaster* sind auf die Aufnahme von Mikroorganismen angewiesen. Sie selbst sind nicht in der Lage eine Reihe essenzieller Nährstoffe zu produzieren, daher müssen sie diese mit der Nahrung zu sich nehmen, was sie in der Regel über den Verzehr verschiedener Hefespezies (und evtl. auch Bakterien) erreichen. In Anwesenheit eines Schimmelpilzes ist zu beobachten, dass die Fliegenlarven sich in den ersten ein bis zwei Entwicklungsstadien um die Schimmelpilz-Kolonien herum aggregieren und die äußeren Hyphen des jungen Myzels stark schädigen. Da die distalen Enden der Hyphen Orte einer verstärkten synthetischen Aktivität der Schimmelpilze sind, ist dort eine erhöhte Ansammlung von energiereichen Substanzen und Bestandteilen der Proteinbiosynthese zu finden. Somit würden die Hyphenspitzen eine energiereiche Nahrungsquelle für *D. melanogaster* darstellen. Im Falle Mykotoxin-produzierender Schimmelpilze wäre der Verzehr pilzlicher Hyphen allerdings mit dem Nachteil der gleichzeitigen Aufnahme toxischer Substanzen verbunden. Zu klären bleibt, in welchem Umfang die Larven das Myzel zu sich nehmen: Erfolgt dies im Sinne zielgerichteter Energie- und Substanzaufnahme oder als aktive Zerstörung der Wachstumszone der konkurrierenden Schimmelpilze.

Larvalmortalität von *Drosophila* – Abhängigkeit von Sekundärmetaboliten-Produktion

Die Mortalität unter den *Drosophila*-Larven zeigte sich als von der Identität des Schimmelpilzes abhängiges Phänomen. Die Schimmelpilzarten mit einer höheren Vielfalt an Mykotoxinen, und weiteren Sekundärmetaboliten im Allgemeinen (*A. fumigatus* & *A. flavus*), führten zu bedeutend geringerem Überleben als die Art mit einem kleinen Spektrum an Mykotoxinen (*A. nidulans*, nach bisherigem Wissensstand) (Kapitel 5). Unterschiedliche Mykotoxine haben eine variierende Toxizität (letale Dosis). Dies kann dadurch zustande kommen, dass konfrontierte Insekten eine Resistenz gegen bestimmte Toxine entwickeln konnten (LEE & CAMPBELL 2000). Bleibt eine ausreichend intensive und häufige Konfrontation aus, ist nicht mit der Entwicklung von Resistenzen in antagonistischen Insekten und der Entwicklung von Gegenmaßnahmen in den Schimmelpilzen (gesteigerte Mykotoxin-Toxizität) zu rechnen. Spekulativ wäre, dass es sich bei Toxinen mit einer höheren Toxizität um evolutiv neuere Metabolite handelt, die sich in den produzierenden Individuen im Verlauf der Evolution entwickelt haben, als Gegenanpassung an die Etablierung von Resistenzen in den antagonistischen Insekten.

Weshalb die Mortalität der *Drosophila*-Larven eine Abhängigkeit von der Art des konfrontierten Mykotoxin-produzierenden Schimmelpilzes und somit von unterschiedlichen Sekundärmetaboliten respektive Mykotoxinen zeigte, könnte auch mit der An- bzw. Abwesenheit bestimmter Mechanismen in *Drosophila* zusammenhängen, z.B. Transport-mechanismen oder unterschiedliche Konformationen bestimmter Enzyme, an denen keine funktionsstörenden und somit nachteiligen Effekte durch bestimmte Toxine auftreten. Fehlende Resistenzen von Insekten gegenüber bestimmten Toxinen sind nicht zwingend auf fehlende Konfrontationen mit Mykotoxin-produzierenden Schimmelpilzen zurückzuführen, sondern können darin begründet liegen, dass sich gegen die Wirkungsweise des Toxins, ggf. in Kombination mit anderen Eigenschaften des produzierenden Organismus, nur schwerlich Resistenzmechanismen herausbilden. Durch Kombination verschiedener Toxine können weiterhin synergistische Effekte zu einer erhöhten Toxizität und folglich Mortalität führen.

Werden Schimmelpilze durch gentechnisch generierte Mutation in Regulationsmechanismen ihres Sekundärmetabolismus daran gehindert, ihre Mykotoxine zu synthetisieren, resultiert daraus eine erhöhte Überlebenswahrscheinlichkeit für die Insektenlarven, die sich in Anwesenheit des derart veränderten Schimmelpilzes entwickeln (Kapitel 6). Dennoch waren, abhängig von der Art des Schimmelpilzes, auch die in ihrem Sekundärmetabolismus defizienten Mutanten in der Lage, ganze Populationen von *Drosophila*-Larven zu töten. Die Ursache hierfür könnte sein, dass der Sekundärmetabolismus nicht vollständig über den globalen Regulator LaeA, der in den hier verwendeten Sekundärmetabolit-Defizitmutanten manipuliert wurde, gesteuert wird, oder dass den Schimmelpilzen weitere bislang unbekannte Regulationswege zur Verfügung stehen. Durch zusätzliche Regulationswege, die unabhängig vom Sekundär-metaboliten-Regulator LaeA sind, könnten Teile des Sekundärmetabolismus trotz Deletion von LaeA aktiv bleiben und die Synthese von Mykotoxinen ermöglichen. Nichtsdestotrotz unterstützen die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse die Hypothese, dass pilzliche Sekundärmetabolite eine wichtige Funktion bei Abwehr von bzw. dem Schutz gegenüber antagonistischen Insekten übernehmen.

Es konnte auch gezeigt werden, dass die in Pilzen produzierten Oxylipine, welche die Synthese von Sekundärmetaboliten steuern, möglicherweise indirekt das Überleben der konkurrierenden Insekten-Larven beeinflussen. Wie genau diese Regulationswege in Schimmelpilzen zusammenhängen, muss weiterhin geklärt werden. Oxylipine sind in Pflanzen an der Signaltransduktion beteiligt (BLÉE 2002, HALITSCHKE & BALDWIN 2004, PAUW & MEMELINK 2005, WASTERNAK 2005), die äußere Reize in einer Signalkaskade bis zu Orten der Synthese von z.B. Toxinen weiterleiten können (DUFFEY & STOUT 1996, KEINANEN et al. 2001, TSCHARNTKE et al. 2001). Für Schimmelpilze indes bleibt die interessante Frage offen, ob sie, wie Pflanzen (siehe auch Kapitel 3), auf äußere Einflüsse (Elicitoren) reagieren können und spezifisch auf die Anwesenheit von Konkurrenten und/oder Prädatoren reagieren. Möglicherweise sind sie durch die Nutzung solcher weiteren Signalwege in der Lage, in andere regulatorische Signalwege des Sekundärmetabolismus einzugreifen und so diese zusätzlich zu aktivieren, unabhängig vom regulären Transkriptionslevel der jeweiligen Entwicklungsphase des Schimmelpilzes. Durch die Weiterleitung von äußeren Reizen könnten evtl. auch blockierte Signalwege, wie sie z.B. in den LaeA-Defizitmutanten vorhanden sind, wieder reaktiviert werden, wenn das weitergeleitete Signal nach der Funktionsstörung der Signaltransduktion (*downstream*) in die Signalkaskade eingreift und hierdurch eine Reaktivierung mechanistisch möglich ist.

Der Einsatz der Sekundärmetabolit-Defizitmutante zeigte, dass es nicht der Schimmelpilz in seiner Eigenschaft als ressourcenverbrauchender Organismus an sich ist, der zur erhöhten Larvalmortalität führt, sondern dass dessen Sekundärmetabolite der ausschlaggebende Faktor sind. Das Wirken der Pilze als Entomopathogen konnte indessen ausgeschlossen werden.

Schimmelpilze können über ein Arsenal an chemischer Verteidigung in Form von Sekundärmetaboliten verfügen. Fehlen ihnen diese, erfahren sie eine stärkere Schädigung durch Antagonisten, sowohl durch Konkurrenten (diese Arbeit, Kapitel 6) als auch durch Prädatoren (ROHLFS et al. 2007). Eine derartige chemische Verteidigung von Mikroorganismen gegenüber tierischen Konkurrenten konnte auch in anderen Systemen beschrieben werden (BURKEPILE et al. 2006). Entsprechend der Erwartung führt die Reduktion der Sekundärmetabolite durch genetische Manipulation zu einer stärkeren Schädigung der Pilze durch die Konfrontation mit Larven von *Drosophila*. Auch die Schädigung geschah nicht unabhängig von der Art des Schimmelpilzes und ist möglicherweise auf eine artspezifisch höhere Vielfalt an Sekundärmetaboliten, wie Mykotoxinen, zurückzuführen. Die stärkere Hemmung des Koloniewachstums durch *Drosophila*-Larven bei chemisch defizienten Pilzen verdeutlicht die Schutzfunktion der Sekundärmetabolite für den Pilz.

Genetische Variabilität in *Drosophila*-Populationen – Experimentelle Evolution

In natürlichen Populationen von *Drosophila* kann ein hohes Maß an Variation in morphologischen, physiologischen und das Verhalten betreffende Eigenschaften durch genetisch vererbare Variation erklärt werden. Dass diese Variabilität aufrecht erhalten bleibt, kann an unterschiedlichen Vor- und Nachteilen dieser Eigenschaften liegen, die sich in unterschiedlicher Intensität bei variierenden äußeren Bedingungen ausprägen. Führen abiotische und biotische Bedingungen dazu, dass ein Merkmal favorisiert wird, also sich als Vorteil für Überleben/Fekundität herausstellt, werden demgemäß Individuen, die dieses Merkmal tragen, einen höheren Reproduktionserfolg haben als jene, die keine Merkmalsträger sind. Steht diese Eigenschaft jedoch in Zusammenhang mit negativ korrelierten Auswirkungen, d.h. in einer Reduktion der Fitness (Reproduktionserfolg pro Lebenszeit), mechanistisch hervorgerufen zugunsten anderer Eigenschaften (*trade-off*), werden die Merkmalsträger beim Ausbleiben der Konfrontation in ihrem Anteil in der Population wieder reduziert werden.

In den Populationen von *D. melanogaster* konnte diese genetische Variation in Bezug einer erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit der Larven, konfrontiert mit dem Schimmelpilz *A. nidulans*, gefunden werden (Kapitel 7). Larven aus Populationen, die wiederholt während ihrer Larvalphase mit *A. nidulans* Kolonien konfrontiert wurden (14 Mal in 26 Generationen), hatten eine um 20-30% gesteigerte Überlebenswahrscheinlichkeit bei Konfrontation mit *A. nidulans*, als Larven aus Kontroll-Populationen, die zuvor nicht mit Schimmelpilzen konfrontiert worden waren. Diese erhöhte Überlebenswahrscheinlichkeit der Larven in der Konfrontation mit *A. nidulans* blieb für mehrere Generationen nach dem letzten Selektionszyklus erhalten. Dabei ging sie einher mit einer gesteigerten Resistenz gegenüber dem Mykotoxin Sterigmatocystin als korrelierte Antwort.

Die genetische Variabilität in der Toleranz gegenüber *A. nidulans* und der damit korrelierten Resistenz gegenüber Sterigmatocystin in Populationen von *D. melanogaster* zeigt, dass Konfrontationen mit Toxinen und/oder Toxin-produzierenden Schimmelpilzen in einer heterogenen Umwelt stattfinden können. Das bedeutet, dass in Teilpopulationen diese Merkmale aufrechterhalten werden, während in anderen Teilpopulationen, möglicherweise zugunsten anderer Fitnessvorteile, sich diese Toleranz/Resistenz nicht etabliert.

Die Annahme, dass eine gesteigerte Überlebenswahrscheinlichkeit in *Drosophila* zu einer gesteigerten Schädigung des antagonistischen Schimmelpilzes führt, konnte hier nicht gezeigt werden. Die selektierten Fliegen-Populationen übten keinen stärker negativen Einfluss auf das Pilzwachstum aus als die nicht selektierten Kontrollpopulationen. Folglich handelt es sich um eine gesteigerte Toleranz, die per definitionem (RÅBERG et al. 2009) keinen Einfluss auf die Fitness des Antagonisten hat, und somit auch keinen selektiven Druck auf diesen ausüben kann. Eine Veränderung konnte hier nur einseitig, in der Entwicklung eines gesteigerten Überlebens auf der Seite der Insekten, gezeigt werden. Demzufolge kann aus den erhaltenen Ergebnissen nicht geschlossen werden, dass Mykotoxine und Resistenzen gegenüber diesen, in einem ko-evolutiven Prozess entstanden sind. Möglicherweise erfolgt eine verstärkte Schädigung der Pilze erst indirekt durch eine Erhöhung der Fliegendichte innerhalb eines Areales. Überleben mehr Larven die Konfrontation und steigt somit in der folgenden Generation die Anzahl weiterer Larven, könnte ein ausreichend großer Selektionsdruck zu einer Veränderung der Mykotoxin-Zusammensetzung erfolgen. Evtl. befindet sich der ko-evolutive Prozess der Interaktion der verwendeten Schimmelpilze und *Drosophila* zum Beobachtungszeitpunkt in einer Phase, in der die Schimmelpilze im evolutionären Wettlauf einen Vorsprung haben, der auch durch die gesteigerte Toleranz der selektierten Fliegenpopulationen nicht eingeholt werden konnte. Durch diese Überlegung kann eine Ko-Adaptation nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden.

Die zugrundeliegenden Mechanismen der gesteigerten Schimmelpilz-Toleranz und Mykotoxin-Resistenz in *Drosophila* bleiben vorerst weiter offen. Gesteigerte oder effizientere Detoxifizierung und Ausscheidung der Mykotoxine und ihrer Abbauprodukte, sowie DNA-Reparaturmechanismen, könnten beteiligt sein. Die auffällige Spezifität der Toleranz-/Resistenz-Antwort gegenüber *A. nidulans* und dem von ihm gebildeten Mykotoxin, kann auf einen spezifisch durch diese Schimmelpilzart hervorgerufenen und induzierten Mechanismus schließen lassen. Hingegen kann beispielsweise eine Resistenz gegenüber einem künstlichen Insektizid, die auf ein bestimmtes Gen zurückzuführen ist, auch weitere Resistenzen gegenüber anderen Insektiziden vermitteln (DABORN et al. 2002, JOUBEN et al. 2008).

Ebenso bleibt die Frage hier ungeklärt, ob zwischen den beiden beobachteten Phänomenen, gesteigertes Überleben bei Konfrontation mit dem Schimmelpilz *A. nidulans* und gesteigertes Überleben in der Konfrontation mit dem Mykotoxin Sterigmatocystin, ausschließlich ein korrelativer oder ein kausaler Zusammenhang besteht.

Mechanistische Grundlagen einer gesteigerten Toleranz – erste Hinweise

Zur Ermittlung der mechanistischen Grundlagen, die zu einer gesteigerten Toleranz führen könnten, wurden Genexpressionsanalysen in *D. melanogaster*-Larven durchgeführt. Diese erste Untersuchung sollte zeigen, welche physiologischen Funktionen an der Interaktion von *Drosophila* mit Schimmelpilzen beteiligt sind. Hierzu wurden L2-Larven von *D. melanogaster* für 24 Stunden mit *A. nidulans* WT konfrontiert, die RNA der konfrontierten Larven isoliert und Gesamtgenom-Mikroarrays durchgeführt (für die genaue experimentelle Anordnung und Durchführung der molekularen Arbeiten siehe Anhang A2). Nach vorläufigen Auswertungen, konnten Gene in mehreren funktionell relevanten Bereichen gefunden werden, die aufgrund der Konfrontation mit *A. nidulans* in ihrer Expression hochreguliert waren. Teilweise waren Gene, die an Reaktionen des Immunsystems beteiligt sind, wie z.B. der Synthese des antimikrobiellen Peptids Metchnikowin, sowie Gene von Katabolismus-Reaktionen (hier der Abbau von Insektiziden), z.T. um mehr als 2fach stärker exprimiert als in den Larven der Kontrollansätze (Larven, die nicht mit *A. nidulans* WT konfrontiert worden waren). Darüber hinaus wurden mehrere Gene, die in Prozessen der Apoptose, aber auch Gene die an DNA-Reparaturmechanismen beteiligt sind, vermehrt exprimiert (Abb. 8-1). Letzteres kann durch die mutagene Wirkung von Mykotoxinen, wie z.B. das Sterigmatocystin, in einen funktionellen Zusammenhang gebracht werden. Für einige der hochregulierten Gene ist die Funktionalität experimentell nachgewiesen, für andere wird durch Strukturanalysen und Strukturübereinstimmungen eine entsprechende Funktion angenommen (FlyBase: <http://flybase.org>).

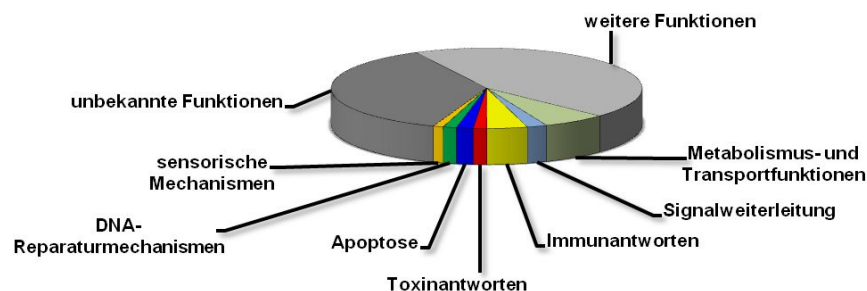


Abb. 8-1 Vorläufige Daten zur Genexpression in *D. melanogaster*-Larven

Die >280 Gene, die in der Behandlung mit *A. nidulans* um mehr als das 1,5fache stärker exprimiert wurden als in Larven der Kontrollbehandlung, sind ihren z.T. durch strukturelle Übereinstimmungen z.T. durch experimentelle Belege ermittelten Funktionen zugewiesen.

Nach weiterer Auswertung der erhaltenen Daten durch statistische Analysemethoden und Verifizierung von zumindest einem Teil der signifikant stärker exprimierten Gene mittels quantitativer PCR-Methoden, könnten Überprüfungen der Funktionalität der jeweiligen Gene weiteren Aufschluss bringen. Idealerweise sollte hierfür ein System verwendet werden, bei dem sowohl Null-Mutanten (das entsprechende Genprodukt lässt sich nicht mehr nachweisen), als auch Überexpressions-Mutanten zur Verfügung stehen. Darüber hinaus ist auch die Betrachtung von Genen interessant, die eine verminderte Expression aufweisen.

Perspektiven – Ausblick auf weitere Forschungsansätze

Die Hypothese, dass sich Toleranzen/Resistenzen in *D. melanogaster* parallel zu einer steigenden Toxizität von Schimmelpilzen entwickeln, muss weiter in einem ko-evolutiven experimentellen Ansatz, bei dem beide Antagonisten einer gegenseitigen Selektion unterzogen werden, geprüft werden. Schwierigkeiten könnten hier durch den zumindest in den Fliegenlarven graduell zu steigenden Selektionsdruck entstehen, da bei Verwendung von älteren Schimmelpilzkolonien bei gleichbleibender Larvendichten potenziell ein geringerer Einfluss auf den Pilz ausgeübt würde. Es müsste ein experimentelles Design erstellt werden, in dem sowohl gleichbleibende Bedingungen als auch notwendige Veränderungen für die jeweiligen Interaktionspartner gegeben sind. Weiterhin müsste der Habitus von Schimmelpilzen berücksichtigt werden. Mit seiner dezentralen Reproduktions- und Metabolismus-Aktivität könnten sich einzelne Bereiche einer Kolonie differenziell entwickeln (SCHOUSTRA et al. 2005). Veränderungen, die sich in Teilabschnitten einer Kolonie etablieren konnten, werden somit nicht an alle Nachkommen der Kolonie über die Konidien weitergegeben. Hierbei stellt sich die Frage, ob Konidien nur aus dem Segment, in dem ein verstärktes Wachstum respektive eine verringerte Schädigung festgestellt wurde, zur weiteren Konfrontation verwendet werden, oder Konidien der gesamten Schimmelpilzkolonie. Letzteres könnte die Etablierung von Veränderungen verzögern, da zum selben Zeitpunkt eine Vielzahl an weniger toleranten Geno- bzw. Phänotypen in den folgenden Selektionsschritt mitgenommen werden.

Welche mechanistischen Funktionen führen zu gesteigertem Überleben der Larven?

Die Frage, ob die Fliegenlarven direkt auf die Mykotoxine oder andere Eigenschaften der Pilze reagieren, könnte in einem erweiterten Genexpressionsansatz untersucht werden. Hierzu müssten parallele Experimente zur Analyse von Expressionslevel in Larven durchgeführt werden, die mit einem Wildtyp-Schimmelpilz, einer Sekundärmetabolit-Defizitmutante derselben Art bzw. mit Mykotoxinen konfrontiert wurden. Durch den Einsatz der Sekundärmetabolit-Defizitmutante könnte in Erfahrung gebracht werden, ob die Reaktion in den Larven auf der alleinigen Anwesenheit des Schimmelpilzes beruht, oder ob zwischen der Konfrontation mit pilzlichen Antagonisten und Mykotoxinen differenziert wird.

Um zu klären, auf welche mechanistische Funktion im durchgeführten Selektionsexperiment der *D. melanogaster*-Populationen selektiert wurde, müssten Untersuchungen zu Unterschieden zwischen den selektierten und den Kontroll-Populationen in Bezug auf Expressionslevel oder Sequenzunterschiede bestimmter Gene durchgeführt werden. Möglicherweise liegt der erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit eine verstärkte Expression verschiedener Gene zugrunde, und/oder unterschiedliche Allele haben sich in den toleranteren Populationen akkumuliert.

Die gesteigerte Toleranz gegenüber *A. nidulans* in *Drosophila*-Populationen, die durch gerichtete Selektion mit dem Schimmelpilz erzielt wurde, ging einher mit einer gesteigerten Resistenz gegenüber dem Mykotoxin Sterigmatocystin als korrelierte Antwort. Die Durchführung einer Selektion, in der Fliegen-Populationen in wiederkehrender Weise mit einem Mykotoxin

konfrontiert werden und anschließende Untersuchungen auf gesteigerte Schimmelpilz-Resistenz, könnten weitere Evidenz einer Kausalität zwischen dem gesteigerten Überleben in der Konfrontation mit Schimmelpilzen und Mykotoxinen erbringen. Um eine direkte Verbindung herleiten zu können, sollten beide Selektionsansätze parallel erfolgen.

Können Schimmelpilze auf äußere Reize reagieren?

Zur Aufdeckung von möglicherweise vorhandenen spezifisch regulierten Verteidigungsmechanismen in den Schimmelpilzen, wäre eine Untersuchung der Expressionslevel, potenziell beteiligter Gene der Pilze, sowie ein Screening der am Sekundärmetabolismus beteiligten Gene interessant. In einem genomweiten Ansatz könnten darüber hinaus eventuelle Einflüsse auf den Primärmetabolismus, z.B. in Form einer reduzierten Expression von Genen, die zum Wachstum benötigt werden, zeigen, ob eine Umverteilung von Ressourcen zugunsten einer Verteidigung stattfindet. Ein verstärktes Augenmerk auf Signaltransduktionsketten, die Informationen von außen bis zu Syntheseorten von Mykotoxinen weiterleiten, könnte zu vertieftem Wissen über Mechanismen in der Interaktion von Schimmelpilzen und saprophagen Insekten beitragen und evtl. vorhandene Kommunikation zwischen Arten verschiedener Reiche (*cross kingdom communication*) zeigen. Eine gleichzeitige Analyse der Genexpression in den Fliegen (siehe oben) würde diesen Ansatz komplementieren.

Mit dem verwendeten Modellsystem *Drosophila-Aspergillus* konnte die Beeinflussung von *Drosophila* durch den antagonistischen Schimmelpilz erfolgreich nachgewiesen werden. In einer Reihe von Experimenten wurde wiederholt gezeigt, dass Sekundärmetabolite respektive Mykotoxine eine Schlüsselrolle in der Interaktion zwischen *D. melanogaster* und Schimmelpilzen der Gattung *Aspergillus* spielen. Die zugrunde liegenden Mechanismen sowie evolutive Zusammenhänge müssen weiter untersucht werden.

9. Literatur

- ABRAMS, P. A., 2010 Implications of flexible foraging for interspecific interactions: lessons from simple models. *Functional Ecology* **24**:7-17.
- AGUILAR, F., HUSSAIN, S. P., and CERUTTI, P., 1993 Aflatoxin B1 induces the transversion of G-->T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**:8586-8590.
- AMITANI, R., TAYLOR, G., ELEZIS, E., LLEWELLYN-JONES, C., MITCHELL, J., et al., 1995 Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium. *Infection and Immunity*. **63**:3266-3271.
- AMMUNÉT, T., HEISSWOLF, A., KLEMOLA, N., and KLEMOLA, T., 2010 Expansion of the winter moth outbreak range: no restrictive effects of competition with the resident autumnal moth. *Ecological Entomology* **35**:45-52.
- ANAGNOSTOU, C., LEGRAND, E. A., and ROHLFS, M., 2009 Friendly food for fitter flies? - Influence of dietary microbial species on food choice and parasitoid resistance in *Drosophila*. *Oikos* **Early View**.
- ANDERSEN, M. R. and NIELSEN, J., 2009 Current status of systems biology in Aspergilli. *Fungal Genetics and Biology* **46**:S180-S190.
- ARIMURA, G.-I., KOST, C., and BOLAND, W., 2005 Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1734**:91-111.
- ASHBURNER, M., 1989 *Drosophila* - A laboratory handbook. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York:139 ff.
- ATKINSON, W. and SHORROCKS, B., 1977 Breeding site specificity in the domestic species of *Drosophila*. *Oecologia* **29**:223-232.
- BALDWIN, I. T., 1998 Jasmonate-induced responses are costly but benefit plants under attack in native populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:8113-8118.
- BALDWIN, I. T., KARB, M. J., and OHNMEISS, T. E., 1994 Allocation of 15N from nitrate to nicotine: production and turnover of a damage-induced mobile defense. *Ecology* **75**:1703-1713.
- BAYRAM, Ö., KRAPPMANN, S., NI, M., BOK, J. W., HELMSTAEDT, K., et al., 2008 VelB/VeA/LaeA Complex Coordinates Light Signal with Fungal Development and Secondary Metabolism. *Science* **320**:1504-1506.
- BEGON, M., 1982 Yeast and *Drosophila* In: *The genetics and biology of Drosophila*. Academic Press Inc., London:345-384.
- BEGON, M. E., HARPER, J. L., and TOWNSEND, C. R., 1998 *Ökologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg - Berlin:139-170 und 171-203.
- BENNETT, J. W. and BENTLEY, R., 1989 Whats in a name - microbial secondary metabolism. *Advances in Applied Microbiology* **34**:1-28.
- BENNETT, J. W. and KLICH, M., 2003 Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. **16**:497-516.
- BERENBAUM, M. R., 2002 Postgenomic chemical ecology: from genetic code to ecological interactions. *Journal of Chemical Ecology* **28**:873-896.
- BERGÉ, J., FEYEREISEN, R., and AMICHOT, M., 1998 Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **353**:1701-1705.
- BLECHERT, S., BRODSCHELM, W., HÖLDER, S., KAMMERER, L., KUTCHAN, T. M., et al., 1995 The octadecanoic pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**:4099-4105.
- BLÉE, E., 2002 Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in Plant Science* **7**:315-322.
- BOK, J. W., BALAJEE, S. A., MARR, K. A., ANDES, D., NIELSEN, K. F., et al., 2005 LaeA, a regulator of morphogenetic fungal virulence factors. *Eukaryotic Cell* **4**:1574-1582.
- BOK, J. W., CHIANG, Y.-M., SZEWCZYK, E., REYES-DOMINGUEZ, Y., DAVIDSON, A. D., et al., 2009 Chromatin-level regulation of biosynthetic gene clusters. *Nature Chemical Biology* **5**:462-464.
- BOK, J. W., HOFFMEISTER, D., MAGGIO-HALL, L. A., MURILLO, R., GLASNER, J. D., and KELLER, N. P., 2006a Genomic Mining for *Aspergillus* Natural Products. *Chemistry & Biology* **13**:31-37.
- BOK, J. W. and KELLER, N. P., 2004 LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryotic Cell* **3**:527-535.
- BOK, J. W., NOORDERMEER, D., KALE, S. P., and KELLER, N. P., 2006b Secondary metabolic gene cluster silencing in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* **61**:1636-1645.
- BURKE, M. K. and ROSE, M. R., 2009 Experimental evolution with *Drosophila*. *American Journal of Physiology* **296**:R1847-1854.
- BURKEPILE, D. E., PARKER, J. D., WOODSON, C. B., MILLS, H. J., KUBANEK, J., et al., 2006 Chemically mediated competition between microbes and animals: microbes as consumers in food webs. *Ecology* **87**:2821-2831.
- BUROW, G. B., NESBITT, T. C., DUNLAP, J., and KELLER, N. P., 1997 Seed lipoxygenase products modulate *Aspergillus* mycotoxin biosynthesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**:380-387.

- CALVO, A. M., HINZE, L. L., GARDNER, H. W., and KELLER, N. P., 1999 Sporogenic effect of polyunsaturated fatty acids on development of *Aspergillus* spp. Applied and Environmental Microbiology **65**:3668-3673.
- CALVO, A. M., WILSON, R. A., BOK, J. W., and KELLER, N. P., 2002 Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. Microbiology and Molecular Biology Reviews **66**:447 - 459.
- CAMPBELL, C. K., 1994 Forms of aspergillosis. Plenum, New York:313-320.
- CARSON, H. L., KNAPP, E. P., and PHAFF, H. J., 1956 The yeast flora of the natural breeding sites of some species of *Drosophila*. Ecology **37**:538-544.
- CHINNICI, J. P., 1980 Genetic resistance to aflatoxin B1 toxicity in *Drosophila melanogaster*: Chromosome substitution analysis. Journal of Heredity **71**:275-278.
- CHINNICI, J. P., BOOKER, M. A., and LLEWELLYN, G. C., 1976 Effect of aflatoxin B1 on viability, growth, fertility, and crossing over in *Drosophila melanogaster* (Diptera). Journal of Invertebrate Pathology **27**:255-258.
- CHINNICI, J. P. and MELONE, P. D., 1985 Genetic aspects of aflatoxin B1 resistance in *Drosophila melanogaster*. Journal of Heredity **76**:85-88.
- CHUNG, H., SZTAL, T., PASRICHA, S., SRIDHAR, M., BATTERHAM, P., and DABORN, P. J., 2009 Characterization of *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**:5731-5736.
- CLARK, A. G., 2007 Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. Nature **450**:203-218.
- CLAUDIANOS, C., RANSON, H., JOHNSON, R. M., BISWAS, S., SCHULER, M. A., et al., 2006 A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. Insect Molecular Biology **15**:615-636.
- DABORN, P. J., LUMB, C., BOEY, A., WONG, W., FFRENCH-CONSTANT, R. H., and BATTERHAM, P., 2007 Evaluating the insecticide resistance potential of eight *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes by transgenic over-expression. Insect Biochemistry and Molecular Biology **37**:512-519.
- DABORN, P. J., YEN, J. L., BOGWITZ, M. R., LE GOFF, G., FEIL, E., et al., 2002 A single P450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. Science **297**:2253-2256.
- DAVID, J. R., LEMEUNIER, F., TSACAS, L., and YASSIN, A., 2007 The historical discovery of the nine species in the *Drosophila melanogaster* species subgroup. Genetics **177**:1969-1973.
- DAVIS, N. D., DIENER, U. L., and ELDRIDGE, D. W., 1966 Production of aflatoxins B1 and G1 by *Aspergillus flavus* in a semisynthetic medium. Applied and Environmental Microbiology **14**:378-380.
- DELGADO-VIRGEN, F. and GUZMAN-DE-PEÑA, D., 2009 Mechanism of sterigmatocystin biosynthesis regulation by pH in *Aspergillus nidulans*. Brazilian Journal of Microbiology **40**:933-942.
- DELUCCA, A., BLAND, J., JACKS, T., GRIMM, C., CLEVELAND, T., and WALSH, T., 1997 Fungicidal activity of cecropin A. Antimicrobial Agents in Chemotherapy **41**:481-483.
- DENHOLM, I., DEVINE, G. J., and WILLIAMSON, M. S., 2002 Evolutionary genetics: Insecticide resistance on the move. Science **297**:2222-2223.
- DICKE, M. and DIJKMAN, H., 2001 Within-plant circulation of systemic elicitor of induced defence and release from roots of elicitor that affects neighbouring plants. Biochemical Systematics and Ecology **29**:1075-1087.
- DIENER, U. L., COLE, R. J., SANDERS, T. H., PAYNE, G. A., LEE, L. S., and KLICH, M. A., 1987 Epidermology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. Annual Reviews of Phytopathology **25**:249-270.
- DOBZHANSKY, T., COOPER, D. M., PHAFF, H. J., KNAPP, E. P., and CARSON, H. L., 1956 Differential attraction of species of *Drosophila* to different species of yeasts. Ecology **37**:544-550.
- DORSCH, M., 2007 Einfluss der mikrobiellen Nahrung auf die Entwicklung von *Drosophila*. Diplomarbeit. Christian-Albrechts Universität, Kiel.
- DOWD, P. F., 1988 Synergism of aflatoxin B1 toxicity with the co-occurring fungal metabolite kojic acid to two caterpillars. Entomologia Experimentalis et Applicata **47**:69-71.
- DRILLING, K. and DETTNER, K., 2009 Electrophysiological responses of four fungivorous coleoptera to volatiles of *Trametes versicolor*: implications for host selection. Chemoecology **19**:109-115.
- DUFFEY, S. S. and STOUT, M. J., 1996 Antinutritive and toxic components of plant defense against insects. Archives of Insect Biochemistry and Physiology **32**:3-37.
- DUPAS, S., CARTON, Y., and POIRIE, M., 2003 Genetic dimension of the coevolution of virulence-resistance in *Drosophila* - parasitoid wasp relationships. Heredity **90**:84-89.
- EATON, D. L. and GALLAGHER, E. P., 1994 Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. Annual Review of Pharmacology and Toxicology **34**:135-172.
- EKENGREN, S. and HULTMARK, D., 1999 *Drosophila* cecropin as an antifungal agent. Insect Biochemistry and Molecular Biology **29**:965-972.
- ESSIGMANN, J. M., BARKER, L. J., FOWLER, K. W., FRANCISCO, M. A., REINHOLD, V. N., and WOGAN, G. N., 1979 Sterigmatocystin-DNA interactions: identification of a major adduct formed after metabolic activation in vitro. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **76**:179-183.
- FARMER, E. E. and RYAN, C. A., 1990 Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **87**:7713-7716.
- FARMER, E. E. and RYAN, C. A., 1992 Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. Plant Cell **4**:129-134.
- FAUL, F., ERDFELDER, E., LANG, A.-G., and BUCHNER, A., 2007 G*power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. Behavior Research Methods **39**:175-191.

- FLEMING, A., 1929 On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology* **10**:226-236.
- FOGARTY, W. M., 1994 Enzymes of the genus *Aspergillus*. New York:177-218.
- FOGLEMAN, J. C., STARMER, W. T., and HEED, W. B., 1981 Larval selectivity for yeast species by *Drosophila mojavensis* in natural substrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**:4435-4439.
- FOGLEMAN, J. C., STARMER, W. T., and HEED, W. B., 1982 Comparisons of yeast floras from natural substrates and larval guts of southwestern *Drosophila*. *Oecologia* **52**:187-191.
- FOX, E. M. and HOWLETT, B. J., 2008 Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology* **11**:481-487.
- GANTER, P. F., STARMER, W. T., LACHANCE, M.-A., and PHAFF, H. J., 1986 Yeast communities from host plants and associated *Drosophila* in southern arizona: new isolations and analysis of the relative importance of hosts and vectors on community composition. *Oecologia* **70**:386-392.
- GIBSON, J. B., MAY, T. W., and WILKS, A. V., 1981 Genetic variation at the alcohol dehydrogenase locus in *Drosophila melanogaster* in relation to environmental variation: Ethanol levels in breeding sites and allozyme frequencies. *Oecologia* **51**:191-198.
- GILBERT, D. G., 1980 Dispersal of yeasts and bacteria by *Drosophila* in a temperate forest. *Oecologia* **46**:135-137.
- GILLESPIE, J. P., BAILEY, A. M., COBB, B., and VILCINSKAS, A., 2000 Fungi as elicitors of insect immune responses. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **44**:49-68.
- GUENGERICH, F. P., JOHNSON, W. W., SHIMADA, T., UENG, Y.-F., YAMAZAKI, H., and LANGOUËT, S., 1998 Activation and detoxication of aflatoxin B1. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **402**:121-128.
- HALITSCHKE, R. and BALDWIN, I., 2004 Jasmonates and related compounds in plant-insect interactions. *Journal of Plant Growth Regulation* **23**:238-245.
- HARSHMAN, L. G. and HOFFMANN, A. A., 2000 Laboratory selection experiments using *Drosophila*: what do they really tell us? *Trends in Ecology & Evolution* **15**:32-36.
- HARTMANN, T., 1999 Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids. *Planta* **207**:483-495.
- HAWKSWORTH, D. L., 2001 The magnitude of fungal diversity: The 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* **105**:1422-1432.
- HECK, M. and SPRADLING, A., 1990 Multiple replication origins are used during *Drosophila* chorion gene amplification. *Journal of Cell Biology* **110**:903-914.
- HEED, W. B., STARMER, W. T., MIRANDA, M., MILLER, M. W., and PHAFF, H. J., 1976 An Analysis of the yeast flora associated with cactiphilic *Drosophila* and their host plants in the sonoran desert and its relation to temperate and tropical associations. *Ecology* **57**:151-160.
- HEIL, M., 2008 Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist* **178**:41-61.
- HEIL, M., 2009 Damaged-self recognition in plant herbivore defence. *Trends in Plant Science* **14**:356-363.
- HEIL, M. and TON, J., 2008 Long-distance signalling in plant defence. *Trends in Plant Science* **13**:264-272.
- HOBALLAH, M. E., KÖLLNER, T. G., DEGENHARDT, J., and TURLINGS, T. C. J., 2004 Costs of induced volatile production in maize. *Oikos* **105**:168-180.
- HOCHBERG, M. E. and LAWTON, J. H., 1990 Competition between kingdoms. *Trends in Ecology & Evolution* **5**:367 - 371.
- HOFFMANN, A. A., HALLAS, R. J., DEAN, J. A., and SCHIFFER, M., 2003 Low potential for climatic stress adaptation in a rainforest *Drosophila* species. *Science* **301**:100-102.
- HOFFMANN, A. A. and PARSONS, P. A., 1993 Direct and correlated responses to selection for desiccation resistance: a comparison of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Journal of Evolutionary Biology* **6**:643-657.
- JANZEN, D. H., 1977 Why fruits rot, seeds mold, and meat spoils. *The American Naturalist* **111**:691.
- JOHNSON, W. W. and GUENGERICH, F. P., 1997 Reaction of aflatoxin B1 exo-8,9-epoxide with DNA: Kinetic analysis of covalent binding and DNA-induced hydrolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**:6121-6125.
- JOUBEN, N., HECKEL, D. G., HAAS, M., SCHUPHAN, I., and SCHMIDT, B., 2008 Metabolism of imidacloprid and DDT by P450 CYP6G1 expressed in cell cultures of *Nicotiana tabacum* suggests detoxification of these insecticides in *Cyp6g1*-overexpressing strains of *Drosophila melanogaster*, leading to resistance. *Pest Management Science* **64**:65-73.
- JURJEVIC, Z., RAINS, G. C., WILSON, D. M., and LEWIS, W. J., 2008 Volatile metabolites associated with one aflatoxigenic and one nontoxigenic *Aspergillus flavus* strain grown on two different substrates. *Phytopathologia Mediterranea* **47**:266-271.
- KAMEI, K. and WATANABE, A., 2005 *Aspergillus* mycotoxins and their effect on the host. *Medical Mycology* **43**:95 - 99.
- KARBAN, R. and AGRAWAL, A. A., 2002 Herbivore offense. *Annual Review of Ecology and Systematics* **33**:641-664.
- KARBAN, R., SHIOJIRI, K., HUNTZINGER, M., and MCCALL, A. C., 2006 Damage-induced resistance in sagebush: volatiles are key intra- and interplant communication. *Ecology* **87**:922-930.
- KEARNEY, J. N. and SHORROCKS, B., 1981 The utilization of naturally occurring yeasts by *Drosophila* species, using chemically defined substrates. *Biological Journal of the Linnean Society* **15**:39-56.

- KEINANEN, M., OLDHAM, N. J., and BALDWIN, I. T., 2001 Rapid HPLC screening of jasmonate-induced increases in tobacco alkaloids, phenolics, and diterpene glycosides in *Nicotiana attenuata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**:3553-3558.
- KELLER, A., 2007 *Drosophila melanogaster's* history as a human commensal. *Current Biology* **17**:R77-R81.
- KELLER, N., BOK, J., CHUNG, D., PERRIN, R. M., and SHWAB, E. K., 2006 LaeA, a global regulator of *Aspergillus* toxins. *Medical Mycology* **44**:83-85.
- KELLER, N. P. and HOHN, T. M., 1997 Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology* **21**:17-29.
- KELLER, N. P., TURNER, G., and BENNETT, J. W., 2005 Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nature Reviews of Microbiology* **3**:937-947.
- KELLERMANN, V., VAN HEERWAARDEN, B., SGRO, C. M., and HOFFMANN, A. A., 2009 Fundamental evolutionary limits in ecological traits drive *Drosophila* species distributions. *Science* **325**:1244-1246.
- KELLERMANN, V. M., VAN HEERWAARDEN, B., HOFFMANN, A. A., SGRO, C. M., and NOOR, M., 2006 Very low additive genetic variance and evolutionary potential in multiple populations of two rainforest *Drosophila* species. *Evolution* **60**:1104-1108.
- KEMPKEN, F. and ROHLFS, M., In press, corrected proof Fungal secondary metabolite biosynthesis - a chemical defence strategy against antagonistic animals? *Fungal Ecology*.
- KESSLER, A., HALITSCHKE, R., and BALDWIN, I. T., 2004 Silencing the Jasmonate Cascade: Induced Plant Defenses and Insect Populations. *Science* **305**.
- KIRK, H. D., EWEN, A. B., EMSON, H. E., and BLAIR, D. G. R., 1971 Effect of aflatoxin B1 on development of *Drosophila melanogaster* (Diptera). *Journal of Invertebrate Pathology* **18**:313-315.
- KLICH, M. A., 2009 Health effects of *Aspergillus* in food and air. *Toxicology and Industrial Health* **25**:657-667.
- KOIWA, H., BRESSAN, R. A., and HASEGAWA, P. M., 1997 Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in Plant Science* **2**:379-384.
- KOSALCOVÁ, K., GARCÍA-ESTRADA, C., ULLÁN, R. V., GODIO, R. P., FELTRER, R., et al., 2009 The global regulator LaeA controls penicillin biosynthesis, pigmentation and sporulation, but not roquefortine C synthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Biochimica 91*:214-225.
- KRAAIJEVELD, A., FERRARI, J., and GODFRAY, H., 2002 Costs of resistance in insect-parasite and insect-parasitoid interactions. *Parasitology* **125**:S71 - S82.
- KRAAIJEVELD, A. and GODFRAY, H., 1997 Trade-off between parasitoid resistance and larval competitive ability in *Drosophila melanogaster*. *Nature* **389**:278 - 280.
- KRAAIJEVELD, A. and VAN ALPHEN, J., 1995 Geographical variation in encapsulation ability of *Drosophila melanogaster* larvae and evidence for parasitoid-specific components. *Evolutionary Ecology* **9**:10 - 17.
- KRAAIJEVELD, A. R. and GODFRAY, H. C. J., 2008 Selection for resistance to a fungal pathogen in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* **100**:400-406.
- KRAAIJEVELD, A. R., VAN ALPHEN, J. J. M., and GODFRAY, H. C. J., 1998 The coevolution of host resistance and parasitoid virulence. *Parasitology* **116**:S29-S45.
- LACHAISE, D. and SILVAIN, J.-F., 2004 How two afro-tropical endemics made two cosmopolitan human commensals: the *Drosophila melanogaster*-*D. simulans* palaeogeographic riddle. *Genetica* **120**:17-39.
- LANCASTER, M. C., JENKINS, F. P., and PHILP, J. M., 1961 Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature* **192**:1095-1096.
- LAZZARO, B., SCEURMAN, B., and CLARK, A., 2004 Genetic basis of natural variation in *D. melanogaster* antibacterial immunity. *Science* **303**:1873 - 1876.
- LEE, S.-E. and CAMPBELL, B. C., 2000 In vitro metabolism of aflatoxin B-1 by larvae of navel orangeworm, *Amyelois transitella* (Walker) (Insecta, Lepidoptera, Pyralidae) and codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Insecta, Lepidoptera, Tortricidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **45**:166-174.
- LEMAITRE, B. and HOFFMANN, J., 2007 The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology* **25**:697-743.
- LI, X., SCHULER, M. A., and BERENBAUM, M. R., 2007 Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology* **52**:231-253.
- LIOI, M. B., SANTORO, A., BARBIERI, R., SALZANO, S., and URSINI, M. V., 2004 Ochratoxin A and zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **557**:19-27.
- LLEWELLYN, G. C. and CHINNICI, J. P., 1978 Variation in sensitivity to aflatoxin B1 among several strains of *Drosophila melanogaster* (Diptera). *Journal of Invertebrate Pathology* **31**:37-40.
- MACEL, M., KLINKHAMER, P., VRIELING, K., and VAN DER MEIJDEN, E., 2002 Diversity of pyrrolizidine alkaloids in *Senecio* species does not affect the specialist herbivore *Tyria jacobaeae*. *Oecologia* **133**:541-550.
- MARTINEZ, J. L., 2009 Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution* **157**:2893-2902.
- MATELES, R. I. and ADYE, J. C., 1965 Production of aflatoxins in submerged culture. *Applied Microbiology* **13**:208-211.
- MCLEAN, M. and DUTTON, M. F., 1995 Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: An update. *Pharmacology & Therapeutics* **65**:163-192.
- MCNEILL, J., BARRIE, F. R., and BURDET, H. M., 2006 International code of botanical nomenclature (Vienna Code).
- MELONE, P. D. and CHINNICI, J. P., 1986 Selection for increased resistance to aflatoxin B1 toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Invertebrate Pathology* **48**:60-65.

- MEMELINK, J., VERPOORTE, R., and KIJNE, J. W., 2001 ORCAnization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends in Plant Science* **6**:212-219.
- MONTELL, C., 2009 A taste of the *Drosophila* gustatory receptors. *Current Opinion in Neurobiology* **19**:345-353.
- MÜLLER, G., BURKERT, B., MÖLLER, U., DILLER, R., ROHRMANN, B., et al., 2004 Ochratoxin A and some of its derivatives modulate radical formation of porcine blood monocytes and granulocytes. *Toxicology* **199**:251-259.
- NIEMINEN, S. M., KARKI, R., AURIOLA, S., TOIVOLA, M., LAATSCH, H., et al., 2002 Isolation and identification of *Aspergillus fumigatus* mycotoxins on growth medium and some building materials. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**:4871-4875.
- NIU, G., WEN, Z., RUPASINGHE, S. G., ZENG, R. S., BERENBAUM, M. R., and SCHULER, M. A., 2008 Aflatoxin B1 detoxification by CYP321A1 in *Helicoverpa zea*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **69**:32-45.
- O'GORMAN, C. M., FULLER, H. T., and DYER, P. S., 2009 Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* **457**:471-474.
- OAKESHOTT, J. G., VACEK, D. C., and ANDERSON, P. R., 1989 Effects of microbial floras on the distributions of five domestic *Drosophila* species across fruit resources. *Oecologia* **78**:533-541.
- PAUW, B. and MEMELINK, J., 2005 Jasmonate-responsive gene expression. *Journal of Plant Growth Regulation* **23**:200-210.
- PENNINCKX, I. A. M. A., THOMMA, B. P. H. J., BUCHALA, A., METRAUX, J.-P., and BROEKAERT, W. F., 1998 Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant Defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**:2103-2114.
- PERRIN, R. M., FEDOROVA, N. D., BOK, J. W., CRAMER, R. A., JR., WORTMAN, J. R., et al., 2007 Transcriptional regulation of chemical diversity in *Aspergillus fumigatus* by LaeA. *PLoS Pathogens* **3**:e50.
- PETTIT, R., 2009 Mixed fermentation for natural product drug discovery. *Applied Microbiology and Biotechnology* **83**:19-25.
- PIMENTEL, D., 1991 Diversification of biological control strategies in agriculture. *Crop Protection* **10**:243-253.
- RÅBERG, L., GRAHAM, A. L., and READ, A. F., 2009 Decomposing health: tolerance and resistance to parasites in animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **364**:37-49.
- READER, R. J., WILSON, S. D., BELCHER, J. W., WISHEU, I., KEDDY, P. A., et al., 1994 Plant competition in relation to neighbor biomass: An intercontinental study with *Poa pratensis*. *Ecology* **75**:1753-1760.
- ROBBANA-BARNAT, S., LAFARGE-FRAYSSINET, C., and FRAYSSINET, C., 1989 Use of cell cultures for predicting the biological effects of mycotoxins. *Cell Biology and Toxicology* **5**:217 - 226.
- ROHLFS, M., 2005a Clash of kingdoms or why *Drosophila* larvae positively respond to fungal competitors. *Frontiers in Zoology* **2**:2.
- ROHLFS, M., 2005b Density-dependent insect-mold interactions: effects on fungal growth and spore production. *Mycologia* **97**:996-1001.
- ROHLFS, M., 2006 Genetic variation and the role of insect life history traits in the ability of *Drosophila* larvae to develop in the presence of a competing filamentous fungus. *Evolutionary Ecology* **20**:271-289.
- ROHLFS, M., ALBERT, M., KELLER, N. P., and KEMPKEN, F., 2007 Secondary chemicals protect mould from fungivory. *Biology Letters* **3**:523-525.
- ROHLFS, M. and HOFFMEISTER, T. S., 2003 An evolutionary explanation of the aggregation model of species coexistence. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **270**:S33-S35.
- ROHLFS, M. and HOFFMEISTER, T. S., 2004 Spatial aggregation across ephemeral resource patches in insect communities: an adaptive response to natural enemies? *Oecologia* **140**:654-661.
- ROHLFS, M. and KÜRSCHNER, L., 2009 Saprophagous insect larvae, *Drosophila melanogaster*, profit from increased species richness in beneficial microbes. *Journal of Applied Entomology; im Druck*.
- ROHLFS, M. and OBMANN, B., 2009 Species-specific responses of dew fly larvae to mycotoxins. *Mycotoxin Research* **25**:103-112.
- ROHLFS, M., OBMANN, B., and PETERSEN, R., 2005 Competition with filamentous fungi and its implication for a gregarious lifestyle in insects living on ephemeral resources. *Ecological Entomology* **30**:556-563.
- ROTH, L., FRANK, H., and KORMANN, K., 1990 Giftpilze - Pilzgifte. Nikol Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG, Hamburg:168 ff.
- ROZEN, D. E., ENGELMOER, D. J. P., and SMISETH, P. T., 2008 Antimicrobial strategies in burying beetles breeding on carrion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**:17890-17895.
- SAHGAL, N., NEEDHAM, R., CABANES, F. J., and MAGAN, N., 2007 Potential for detection and discrimination between mycotoxigenic and non-toxigenic spoilage moulds using volatile production patterns: A review. *Food Additives and Contaminants* **24**:1161-1168.
- SANER, C., WEIBEL, B., WÜRGLER, F. E., and SENGSTAG, C., 1996 Metabolism of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **27**:46-58.
- SARGEANT, K., SHERIDAN, A. N. N., O'KELLY, J., and CARNAGHAN, R. B. A., 1961 Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature* **192**:1096-1097.
- SCHMELZ, E. A., LECLERE, S., CARROLL, M. J., ALBORN, H. T., and TEAL, P. E. A., 2007 Cowpea chloroplastic ATP Synthase is the source of multiple plant defense elicitors during insect herbivory. *Plant Physiology* **144**:793-805.

- SCHOUSTRA, S. E., SLAKHORST, M., DEBETS, A. J. M., and HOEKSTRA, R. F., 2005 Comparing artificial and natural selection in rate of adaptation to genetic stress in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Evolutionary Biology* **18**:771-778.
- SEGAL, B. H. and WALSH, T. J., 2006 Current approaches to diagnosis and treatment of invasive aspergillosis. *American Journal of Respiration and Critical Care Medicine* **173**:707-717.
- SERVICE, P. M. and ROSE, M. R., 1985 Genetic covariation among life-history components - The effect of novel environments. *Evolution* **39**:943-945.
- SHIOTSUGU, J., LEROI, A. M., YASHIRO, H., ROSE, M. R., and MUELLER, L. D., 1997 The symmetry of correlated selection responses in adaptive evolution: An experimental study using *Drosophila*. *Evolution* **51**:163-172.
- SINGH, I., DIXIT, A. K., and KUSHWAHA, R. K. S., 2009 Antagonism of *Microsporum* species by soil fungi. *Mycoses* **53**:32-39.
- SMITH, R. L. and SMITH, T. M., 2009 Ökologie. Pearson Studium, München:291-310 und 335-365.
- SPEHR, M. and MUNGER, S. D., 2009 Olfactory receptors: G protein-coupled receptors and beyond. *Journal of Neurochemistry* **109**:1570-1583.
- SPIKES, S., XU, R., NGUYEN, C. A. K., CHAMILOS, G., KONTOYIANNIS, DIMITRIOS A. P., et al., 2008 Gliotoxin production in *Aspergillus fumigatus* contributes to host-specific differences in virulence. *The Journal of Infectious Diseases* **197**:479-486.
- STARMER, W. T. and FOGLEMAN, J. C., 1986 Coadaptation of *Drosophila* and yeasts in their natural habitat. *Journal of Chemical Ecology* **12**:1037-1055.
- STARMER, W. T., PERIS, F., and FONTDEVILA, A., 1988 The transmission of yeasts by *Drosophila buzzatii* during courtship and mating. *Animal Behaviour* **36**:1691-1695.
- STEYN, P. S., 1995 Mycotoxins, general view, chemistry and structure. *Toxicology Letters* **82-83**:843-851.
- STOKES, V. L., BANKS, P. B., PECH, R. P., and SPRATT, D. M., 2009 Competition in an invaded rodent community reveals black rats as a threat to native bush rats in littoral rainforest of south-eastern Australia. *Journal of Applied Ecology* **46**:1239-1247.
- TEKAIA, F. and LATGE, J.-P., 2005 *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Current Opinion in Microbiology* **8**:385-392.
- THOMAS, J. H., 2007 Rapid birth-death evolution specific to xenobiotic cytochrome P450 genes in vertebrates. *PLoS Genetics* **3**:e67.
- THOMAS, M. B. and READ, A. F., 2007 Can fungal biopesticides control malaria? *Nature Review of Microbiology* **5**:377-383.
- TIAN, D., TRAW, M. B., CHEN, J. Q., KREITMAN, M., and BERGELSON, J., 2003 Fitness costs of R-gene-mediated resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **423**:74-77.
- TINGVALL, T. O., ROOS, E., and ENGSTROM, Y., 2001 The imd gene is required for local Cecropin expression in *Drosophila* barrier epithelia. *Embo Reports* **2**:239-243.
- TINSLEY, M., BLANFORD, S., and JIGGINS, F., 2006 Genetic variation in *Drosophila melanogaster* pathogen susceptibility. *Parasitology* **132**:767 - 773.
- TSCHARNTKE, T., THIESSEN, S., DOLCH, R., and BOLAND, W., 2001 Herbivory, induced resistance, and interplant signal transfer in *Alnus glutinosa*. *Biochemical Systematics and Ecology* **29**:1025-1047.
- TSITSIGIANNIS, D. I. and KELLER, N. P., 2006 Oxylipins act as determinants of natural product biosynthesis and seed colonization in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* **59**:882-892.
- TSITSIGIANNIS, D. I. and KELLER, N. P., 2007 Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals. *Trends in Microbiology* **15**:109-118.
- TSITSIGIANNIS, D. I., KOWIESKI, T. M., ZARNOWSKI, R., and KELLER, N. P., 2004 Endogenous lipogenic regulators of spore balance in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* **3**:1398-1411.
- TURLINGS, T. C. J., TUMLINSON, J. H., and LEWIS, W. J., 1990 Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science* **250**:1251-1253.
- TZOU, P., OHRESSER, S., FERRANDON, D., CAPOVILLA, M., REICHHART, J.-M., et al., 2000 Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. *Immunity* **13**:737-748.
- UENG, Y.-F., SHIMADA, T., YAMAZAKI, H., and GUENGERICH, F. P., 1995 Oxidation of aflatoxin B1 by bacterial recombinant human cytochrome P450 enzymes. *Chemical Research in Toxicology* **8**:218-225.
- VAN HEERWAARDEN, B., WILLI, Y., KRISTENSEN, T. N., and HOFFMANN, A. A., 2008 Population bottlenecks increase additive genetic variance but do not break a selection limit in rain forest *Drosophila*. *Genetics* **179**:2135-2146.
- VINING, L. C., 1990 Functions of secondary metabolites. *Annual Review of Microbiology* **44**:395-427.
- VOELCKEL, C. and BALDWIN, I. T., 2004 Herbivore-induces plant vaccination. Part II. Array-studies reveal the transience of herbivore-specific transcriptional imprints and a distinct imprint from stress combinations. *The Plant Journal* **38**:650 - 663.
- VONBERG, R. P. and GASTMEIER, P., 2006 Nosocomial aspergillosis in outbreak settings. *Journal of Hospital Infection* **63**:246-254.
- WANG, C. Y., WANG, Z., LA LEE, M., LI, Z., ZHANG, D. L., et al., 2009 Attraction of pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, to the endoparasitic fungus *Esteya vermicola*. *African Journal of Microbiology Research* **3**:782-786.
- WANG, J.-S. and GROOPMAN, J. D., 1999 DNA damage by mycotoxins. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **424**:167-181.

- WASTERNAK, C., 2005 Introductory remarks on biosynthesis and diversity in actions. *Journal of Plant Growth Regulation* **23**:167-169.
- WASTERNAK, C. and PARTHIER, B., 1997 Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends in Plant Science* **2**:302-307.
- WEBSTER, J. and WEBER, R. W. S., 2007 *Introduction to fungi*. Cambridge University press, Cambridge 297.
- WERTHEIM, B., 2005 Evolutionary ecology of communication signals that induce aggregative behaviour. *Oikos* **109**:117-124.
- WERTHEIM, B., MARCHAIS, J., VET, L. E. M., and DICKE, M., 2002 Allee effect in larval resource exploitation in *Drosophila*: an interaction among density of adults, larvae, and micro-organisms. *Ecological Entomology* **27**:608-617.
- WICKLOW, D. T. and COLE, R. J., 1982 Tremorgenic indole metabolites and aflatoxins in sclerotia of *Aspergillus flavus* - an evolutionary perspective. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **60**:525-528.
- WICKLOW, D. T. and DONAHUE, J. E., 1984 Sporogenic germination of sclerotia in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Transactions of the British Mycological Society* **82**:621-624.
- WILSON, T. G., 2001 Resistance of *Drosophila* to toxins. *Annual Review of Entomology* **46**:545-571.
- WÖLFLE, S., 2008 Experimentelle Evolution der Konkurrenzfähigkeit von *Drosophila* gegenüber Schimmelpilzen. Diplomarbeit. Christian-Albrechts-Universität Kiel.
- WÖLFLE, S., TRIENENS, M., and ROHLFS, M., 2009 Experimental evolution of resistance against a competing fungus in *Drosophila melanogaster*. *Oecologia* **161**:781-790.
- WU, J. and BALDWIN, I. T., 2009 Herbivory-induced signalling in plants: Perception and action. *Plant, Cell & Environment* **32**:1161-1174.
- YU, J., CHANG, P.-K., EHRLICH, K. C., CARY, J. W., BHATNAGAR, D., et al., 2004 Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* **70**:1253-1262.
- ZENG, R., NIU, G., WEN, Z., SCHULER, M., and BERENBAUM, M., 2006 Toxicity of Aflatoxin B1 to *Helicoverpa zea* and bioactivation by cytochrome P450 monooxygenases. *Journal of Chemical Ecology* **32**:1459-1471.

Anhang

A.1 Pilz Linien

Tab. A-1 Liste der *Aspergillus* Linien

Artname	Nr.	Genotyp	Herkunft
<i>A. nidulans</i>	RDIT 2.3	WT	N. Keller; USA, Wisconsin
<i>A. nidulans</i>	RJW 46.4	$\Delta laeA$	N. Keller; USA, Wisconsin
<i>A. nidulans</i>	RJW 49.1	$\Delta laeA::laeA$	N. Keller; USA, Wisconsin
<i>A. fumigatus</i>	AF 293	WT	N. Keller; USA, Wisconsin
<i>A. fumigatus</i>	TJW 54.2	$\Delta laeA$	N. Keller; USA, Wisconsin
<i>A. fumigatus</i>	TJW 68.6	$\Delta laeA::laeA$	N. Keller; USA, Wisconsin
<i>A. flavus</i>	NRRL 3357	WT	N. Keller; USA, Wisconsin
<i>A. flavus</i>	TJW 71.1	$\Delta laeA$	N. Keller; USA, Wisconsin
<i>A. flavus</i>	TJW 79.13	$\Delta laeA::laeA$	N. Keller; USA, Wisconsin
<i>A. nidulans</i>	RDIT 9.32	WT- <i>veA</i>	N. Keller; USA, Wisconsin
<i>A. nidulans</i>	RDIT 59.1	$\Delta ppoB = \Delta ppoB::pyroA\ pyroA4\ veA$	N. Keller; USA, Wisconsin
<i>A. nidulans</i>	RDIT 54.7	$\Delta ppoAC = \Delta ppoA::metG\ \Delta ppoC::trpC\ metG1\ trpC801\ veA$	N. Keller; USA, Wisconsin
<i>A. nidulans</i>	RDIT12.9	$\Delta ppoA = metG1; DppoA::metG; veA$	N. Keller; USA, Wisconsin
<i>A. nidulans</i>	RDIT62.3	$\Delta ppoABC = \Delta ppoA::metG; veA; trpC80$	N. Keller; USA, Wisconsin
<i>A. nidulans</i>	RDIT81.10	$\Delta ppoA = metG1; \Delta ppoA::metG; veA; gpdA(p)::ppoA::trpC$	N. Keller; USA, Wisconsin
<i>A. nidulans</i>	n.b.	WT-Vel= WT zu ΔveA , <i>paba yellow strain</i>	G.H. Braus; D, Göttingen
<i>A. nidulans</i>	n.b.	ΔveA , <i>paba, yellow strain</i>	G.H. Braus; D, Göttingen
<i>A. fumigatus</i>	n.b.	WT-Vel= WT zu ΔveA , <i>green nicht auxotroph</i>	G.H. Braus; D, Göttingen
<i>A. fumigatus</i>	n.b.	ΔveA , <i>green cro auxotroph</i>	G.H. Braus; D, Göttingen

A.2 Material und Methoden zur Genexpression in *Drosophila*

Die verwendeten Microarrays stammten vom *Canadian Drosophila Microarray Center* Ontario, Kanada (<http://www.flyarrays.com>). Es handelte sich um Oligonukleotid-Microarrays des Typs *Oligo 14k Version 1* bei dem >14.000 Oligonukleotide aus dem Genom von *Drosophila melanogaster* jeweils in zweifacher Ausführung, sowie verschiedene Kontrollen vorhanden sind. Insgesamt wurden 5 biologische Replikate durchgeführt. Für das Design wurde ein Farbwechsel (*dye-swap*) gewählt, bei dem jedes zweite biologische Replikat in umgekehrter Anordnung angefärbt wurde.

A.2.1 Konfrontation der *D. melanogaster* Larven mit *A. nidulans* WT

In 35 mm Ø Petrischalen mit 3 ml Standardmedium (siehe Kapitel 4.3.1) wurden mit jeweils 1000 Konidien von *A. nidulans* inokuliert und bei 25°C und einem Tag-/Nachttrhythmus von 14/10 Stunden für 3 Tage inkubiert. Ebenso wurden Kontrollen ohne Konidien angefertigt. Sterile Eier (siehe Kapitel 4.4.1) der *D. melanogaster* Laborpopulation *Kiel 06* wurden auf Standardmedium (siehe Kapitel 4.3.1) in 55 mm Ø Petrischalen für 48 Stunden bei 25°C in einer Feuchtekammer inkubiert. Hier konnten die Larven aus den Eiern schlüpfen und sich zu L2-Larven entwickeln. Jeweils 35 Larven von *D. melanogaster* im L2 Stadium wurden jeweils zu einer Pilzkolonie bzw. in eine Kontroll-Petrischale transferiert. Die Konfrontation fand für 24 Stunden bei denselben Bedingungen wie für das Pilzwachstum statt. Anschließend wurden aus jedem Ansatz 30 Larven entnommen die zusammen als ein biologisches Replikat weiter behandelt wurden.

Box A.2-1 Experimenteller Aufbau zur Konfrontation von *D. melanogaster*-Larven für die Isolierung von RNA und anschließender Genexpressionsanalyse

Pilzart	<i>A. nidulans</i>
Linie	WT
Entwicklungsvorsprung	72 h
Anzahl Larven pro 35 mm Ø Petrischale und 3 ml DZM	35
Replikate	6

A.2.2 RNA-Isolation nach „Phenol-Chloroform-Extraktion“

Die jeweils 30 Larven wurden in 1,5 mL *RNAmagic* transferiert und zweimal auf Trockeneis schockgefroren und auf Eis aufgetaut. Nach Homogenisierung im Glaspotter und Inkubation bei Raumtemperatur (RT) für 5 Minuten, wurden 300 µL *Trichlormethan* zugegeben, gut vermischt und erneut bei RT für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde für 10 Minuten bei 15.000 g und 4°C zentrifugiert. 700 µL der wässrigen Phase wurden entnommen, mit der gleichen Menge an *2-Propanol* gemischt und nach Zugabe von 1,5 µL *Glykogen* zur Fällung der RNA bei -80°C für eine Stunde inkubiert.

Nach 30minütiger Zentrifugation bei 17.000 g (4°C) wurde das RNA-Pellet zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 25 µL RNase-freiem Wasser aufgenommen. Die Qualität und Quantität der RNA wurde mittels Gelelektrophorese und spektral-photometrischer Messung (Nanodrop ND-1000) überprüft.

Box A.2-2 Isolation der RNA

30 Larven je Probe	----
RNAmagic	Bio-Budget, Krefeld
Trichlormethan reinst	Carl Roth, Karlsruhe
2-Propanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol reinst	Carl Roth, Karlsruhe

A.2.3 cDNA-Synthese und Amplifikation der cDNA**Die cDNA-Synthese**

Die Synthese der cDNA fand in einem Umluft-Hybridofen bei 42 °C für die Dauer von 60 Minuten statt. Hierzu wurde das in Box A.2-3 aufgelistete Synthese-Gemisch angesetzt. Durch die Wahl der *Primer* wurde spezifisch die mRNA durch eine reverse Transkription in einzelsträngige cDNA umgeschrieben.

Box A.2-3 cDNA-Synthese, 42 °C, 60 Minuten

4 µL	Wasser (Millipore)	----
2 µL	Prime Script Puffer 5x	Lonza, Köln
1 µL	dNTP-Mix (10mM)	Invitrogen, Karlsruhe
0,5 µL	CapFinder Primer Sp6rG1	(5'-CAG CCG CCG CAG ATT TAG GTG ACA CTA TAG ArGrGrG-3')
0,5 µL	OdT T71 (10 pmol)	(5'-Biot-GAG AGA GGA TCC AAG TAC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA(T)25A/C/G/-3')
0,25 µL	MnCl ₂	Carl Roth, Karlsruhe
0,25 µL	RiboLock™ RNase Inhibitor	Fermentas, St. Leon-Rot
0,5 µL	Prime Script Reverse Transcriptase	TaKaRa über Lonza, Köln
1 µL	RNA aus A.2.2	----

Amplifikation der cDNA

Für die Amplifikation wurde zunächst je biologischem Replikat eine Test-PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) durchgeführt. Anschließend wurde jeweils ein fünffacher Ansatz aller Proben ausgeführt. Die Zusammensetzung des Reaktions-Gemisches ist in Box. A.2-4 dargestellt. Die *in vitro*-Vervielfältigung der cDNA fand in einem *Thermocycler* für 36 Zyklen mit folgender Einstellung statt: 1x eine Minute einleitende Denaturierung bei 95°C; anschließend 36x Wiederholung des Ablaufs: 20 Sekunden (Sek.) Denaturierung bei 95°C, 20 Sek. Primer-Hybridisierung bei 53°C, 2,5 Minuten DNA-Kettenverlängerung bei 72°C; 1x abschließende 5 Minuten 75°C zur Ermöglichung von Korrektur-Lesefunktionen durch die *Pwo*-Polymerase und anschließende Abkühlung des Reaktions-Gemisches auf 4°C zum Stoppen der Reaktion.

Box A.2-4 Amplifikation der cDNA, 36 Zyklen		
39,75 µL	Wasser (Millipore)	----
5 µL	Advantage PCR-Puffer (10x)	Clontech über TaKaRa Saint-Germain-en-Laye Frankreich
2 µL	dNTP-Mix (10mM)	Invitrogen, Karlsruhe
1 µL	Adaptor-Sp6-PCR-Primer	5'- GAC GCC TGC AGG CGA TGA ATT TAG G-3'
1 µL	OdT T7II (10 pmol)	5'-GAG AGA GGA TCC AAG TAC TAA TAC GAC TCA CTA TAG G-3'
0,25 µL	Tap/Pwo (20:1) Polymerase Gemisch	Taq: Invitrogen, Karlsruhe; Pwo: Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
1 µL	cDNA aus A.2.3	----

Aufreinigung der amplifizierten cDNA

Jeweils drei cDNA-PCR-Ansätze pro biologischem Replikat wurden zusammengeführt und gemeinsam aufgereinigt. Hierfür wurden 130 µL *SureClean* (Bioline, Luckenwalde) für 10 Minuten bei RT inkubiert und nach Zugabe von 1 µL Glykogen 10 Minuten bei 15.000 g zentrifugiert. Das cDNA-Pellet wurde anschließend zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 14 µL Wasser (Millipore) aufgenommen.

A.2.4 aa-cRNA-Synthese, Aufreinigung und Anfärbung (*labelling*)

Die Synthese der aa-cRNA

Die Synthese der cDNA fand in einem Umluft-Hybridofen bei 37 °C für die Dauer von 14 bis max. 16 Stunden statt. Hierzu wurde das *T7-Megascript* von Ambion verwendet. Mengenangaben sind in Box A.2-5 aufgelistete. Bei der Synthese der cRNA wurden in einem gewissen Prozentsatz Nukleotide des Typs aaUTP eingebaut. An die Aminoallyl-Gruppe dieser Nukleotide konnten später Farbstoffe kovalent gebunden werden.

Box A.2-5 aa-cRNA-Synthese, 37°C im Hybridofen, 14-16 Stunden; T7-Megascript von Ambion, Applied Biosystems, Darmstadt		
4 µL	DEPC-Wasser	----
jeweils 2 µL	ATP, GTP und CTP (75 mM)	Ambion, zusätzlich
1 µL	UTP (75 mM)	
1,5 µL	aaUTP (75 mM)	
2 µL	Puffer (10x)	
3 µL	Template cDNA (400-800 ng)	
2 µL	T7-Enzymmix	

Aufreinigung des aa-cRNA-Syntheseproduktes

Die Reinigung des aa-cRNA-Syntheseproduktes erfolgte mittels *NucleoSpin RNA II Kit* von *Macherey-Nagel* (Düren). Abweichend von der Arbeitsanleitung wurde kein DNA-Verdau durchgeführt und die Säulen zweifach mit jeweils 50 µL Wasser (Millipore) zur Eluierung der aa-cRNA gewaschen.

Die aa-cRNA wurde anschließend mit 10 µL Natriumacetat (3M), 250 µL Ethanol (96-100%ig) und 1 µL Glykogen für eine Stunde bei -80°C gefällt. Nach Zentrifugation bei 17.000 g und 4°C für 30 Minuten wurde das aa-cRNA-Pellet zweimal gewaschen, bei RT getrocknet und in 7 µL Wasser (Millipore) resuspendiert.

Anfärben der aa-cRNA (*labeling*)

3,33 µL der aa-cRNA aus der voran beschriebenen Synthese wurde mit 6,67 µL Natriumhydrogencarbonat-Puffer (0,3 M, pH-Wert = 9) vermischt und 10 µL des Farbstoffes Alexa Fluor® 647 bzw. Alexa Fluor® 555 (Molecular Probes über Invitrogen™, Karlsruhe) hinzugegeben. Diese wurden zuvor jeweils pro Verpackungseinheit in 20 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Die Färbereaktion wurde für zwei Stunden bei RT unter Abschottung von Licht durchgeführt. Anschließend wurde die angefärbte aa-cRNA mittels des *NucleoSpin RNA II Kits* gereinigt (siehe hierzu den Abschnitt „Aufreinigung des aa-cRNA-Syntheseproduktes“). Nach Fällung wurden die Proben jeweils in 5 µL Wasser (Millipore) aufgenommen.

A.2.5 Hybridisierung der Microarrays

Vorbereitung und Durchführung der Hybridisierung

Es wurden 200 pmol je Probe (Behandlung und Kontrolle) der angefärbten aa-cRNA in einem Endvolumen von 2,5 µL in Wasser (Millipore) gelöst. Hier wurden 40 µL des Hybridisierungspuffers bestehend aus 54 µl DigEasyHyb (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), 2,88 µL tRNA aus Hefe mit 10 mg/ml (Ambion Applied Biosystems, Darmstadt) und 2,88 µL DNA aus Lachssperma mit 100 mg/ml (Sigma, Steinheim) zugegeben und für 10 Minuten bei 65°C unter Abschottung des Lichts denaturiert.

Ein staubfreier und trockener Microarray wurde mit einem Deckglas (LifterSlip, Implen, München) abgedeckt in eine Hybridisierungskammer gelegt und auf 42°C vortemperiert. Das aa-cRNA/Hybridisierungspuffer-Gemisch wurde zwischen Deckglas und den Träger pipettiert und durch Kapillarkräfte zwischen die beiden Schichten gezogen. Die Kanten wurden mit einem flexiblen und wieder ablösbaren Montagekleber, sowie anschließend die Hybridisierungskammer mit einer Abdeckplatte verschlossen. Die Hybridisierung fand in einem Umluft-Hybridisierungssofen bei 42°C für 16 bis maximal 18 Stunden statt.

Waschen der Microarrays

Das Deckglas wurde in einem Waschpuffer (1fach SSC, siehe Box A.2-5), sowie Reste des Montageklebers vom Objektträger entfernt. Überschüssige nicht gebundene aa-cRNA und Farbstoffreste wurden in mehreren aufeinander folgenden Schritten abgewaschen. Hierzu wurden Waschpuffer verschiedener Konzentrationen und Temperaturen verwendet. Die Microarrays befanden sich in einem Zentrifugenröhrchen (50ml), das mit dem jeweiligen Waschpuffer gefüllt und auf einem Rollenmischer für die entsprechende Dauer des Waschvorganges gelegt wurde. Die Zentrifugenröhrchen waren hierbei mit Aluminiumfolie umwickelt um Lichteinstrahlung zu verhindern. Die Abfolge der Waschschrte ist in der Box A.2-6 dargestellt.

Box A.2-5 Waschen der Mikroarrays

1 Stunde	1fach SSC bei RT
2 x jeweils 15 Minuten	1fach SSC + 0,1 % (v/v) Triton* bei 60°C
2 x jeweils 15 Minuten	0,1fach SSC + 0,1 % (v/v) Triton* bei 37°C
30 Sekunden	0,1fach SSC bei RT
10 Sekunden	bi-destilliertes Wasser
anschließend	mit bi-destilliertem Wasser abgespült und mit Stickstoff getrocknet
20fach SSC	175,3 g Natriumchlorid 88,2 g Natriumacetat auf einen Liter bi-destilliertes Wasser, pH-Wert = 7 mit HCl eingestellt
* Triton	Alkylphenylpolyethylenglykol, Carl Roth

Einlesen der Mikroarrays und vorläufige Auswertung

Die Mikroarrays wurden mit einem Scanner der Typbezeichnung GenePix^{MT} 4000B bei einer Wellenlänge von 532 nm und 635 nm eingelesen. Zur Bearbeitung der eingelesenen Bilder wurde das Programm GenePix Pro 6.0 verwendet. Erste vorläufige Analysen der Genexpression wurden mit dem Internet-gestützten Programm GeneTraffic DUO (vormals Iobion@Informatics jetzt Stratagene) durchgeführt.

Zu beachten ist, dass zur präziseren Auswertung der Ergebnisse statistische Methoden ausstehend sind, sowie die Verifizierung der erhaltenen Daten mittels quantitativer Analyse der Genexpression.

A.3 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
AF	A flatoxin; Mykotoxin
AFBO	Epoxid des Aflatoxin B1
AMP	A nti m ikrobielle P eptide
ANOVA	Statistischer Test zur Varianzanalyse; analysis of variance
d.f.	Freiheitsgrade; degrees of freedom
DMSO	D imethyl s ulfoxid
DZM	Drosophila-Zucht-Medium ; Standardmedium zur <i>Drosophila</i> Zucht
HAMP	h erbivory a ssociated m olecular p atterns
JA	Jasmonsäure; jasmonic acid
<i>laeA</i>	L oss of <i>afIR</i> expression; globaler Sekundärmetabolismus Transkriptionsfaktor
ME	M alz e xtrakt
n.b.	n icht b ekannt
OC	O chratoxin; Mykotoxin
PBO	P iperonyl- B utoxid
PE	P enicillin; antibiotisch wirkender Stoff
ppo	p si- p roducing o xygenases
Psi	p recocious s exual i nducer
RKI	R elative K onkurrenz I ntensität
RT	R aum t emperatur
ST	S terigmatocystin; Mykotoxin
<i>veA</i>	Velvet
WT	W ild t yp

A.4 Danksagung

Mein größter Dank gilt Dr. Marko Rohlf!!! Ihm habe ich es zu verdanken, dieses Projekt bearbeiten gedurft zu haben, mit all seinen vielseitigen Möglichkeiten und Chancen, die es geboten hat!!! Für seine eigene, offene Art der Betreuung, des Gedankenaustauschs. Behalte deine Neugierde, deine Begeisterungsfähigkeit, deine Unkompliziertheit, deinen Humor! Und hab vielen Dank für all das!!!

Bei Herrn Prof. Dr. Hinrich Schulenburg möchte ich mich bedanken, für die „freundliche!“ Übernahme der Abteilung und meiner Betreuung in einer sicherlich nicht einfachen und chaotischen Zeit. Für kritische Anmerkungen und Kommentare zu meiner Arbeit und für seiner Unterstützung während der Fertigstellung!

Bei Herrn Prof. Dr. Thomas Roeder und seinen Mitarbeitern dafür, dass ich zur Bearbeitung von Teilen dieser Arbeit seine Einrichtung nutzen durfte. Ein besonderer Dank gilt hier Christine Fink, für die Einweisung in die Techniken der Molekularbiologie.

Bei Nele Lefeldt bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchung zur Larvalmortalität (Kapitel 6) im Rahmen ihres Forschungspraktikums.

Ich möchte mich bei denen bedanken, die mich in ihrer Abteilung aufgenommen haben, für das gemeinsame Arbeiten, die gemeinsamen Pausen und Gespräche, für die praktische und mentale Unterstützung. Insbesondere gilt mein Dank hier Monika Dorsch, Nina Tödt, Marko Dittmann, Lars Kürschner, Christina Griebner, Susanne Wölfle und Peter Martin, sowie Prof. Dr. Thomas Bauer für die vorübergehende Übernahme meiner Betreuung.

Ebenso möchte ich mich bei der neuen Gruppe bedanken, für ihre Kommentare, ihren Rat und zerstreute Gespräche: Rania Nakad, Katja Dierking und Gunther Jansen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Christiana Anagnostou, dafür, dass sie mir stets zur Seite gestanden hat, mir insbesondere durch die schwierigen Zeiten geholfen hat, für so vieles, dass es kaum in Worte zu fassen ist!

Bedanken möchte ich mich auch bei denen, die auch aus der Entfernung das Interesse nicht verloren haben. Gaby, Christina, Marco, David. Viel Zeit blieb nicht für euch, das tut mir leid. Ich versuche mich zu bessern, versprechen kann ich's nicht...

Bei all denen die mich bewusst oder unbewusst unterstützt haben und hier namentlich keine Erwähnung finden, auch euch gebührt mein Dank.

**Es hätte noch viel zu tun gegeben – Es gibt noch viel zu tun,
packen wir es an!**



A.5 Lebenslauf

Name Monika Trienens

Geburtsdatum 01.12.1979

Geburtsort Salzkotten, NRW, Germany

Nationalität Deutsch

Ausbildung:

Schule Einschulung 1986

 Abitur 1999 an der Gesamtschule Paderborn – Elsen

 Schwerpunkt Biologie/Chemie

Studium Studiengang *Diplom Biologie* an der Universität Bielefeld

 WS 1999/2000 bis SS 2005

 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Experimentelle Ökologie und Ökosystembiologie

 Titel der Arbeit: „*Autökologische Untersuchungen neophytischer und indigener Arten nährstoffarmer Habitats im Juvenilstadium*“

Promotion Mai 2007-April 2010 an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Zoologisches Institut – Abteilung Evolutionsökologie und –genetik (ehemals Tierökologie)

 Titel der Arbeit: *Interaktionen zwischen saprophagen Insekten und Schimmelpilzen – Eine evolutionsökologische Analyse*

A.6 Erklärung

Hiermit versichere ich,

die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Zuhilfenahme weiterer außer den angegebenen Hilfsmitteln und der Beratung meines Betreuers angefertigt zu haben;

diese Arbeit bisher nicht im Rahmen eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt zu haben;

dass ich die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft angefertigt habe.

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht bzw. wurden zur Veröffentlichung eingereicht.

Kiel, den

