

Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	VII
Abkürzungen.....	VIII

1 Einleitung.....	1
1.1 Von der Epidemie zur Agrochemikalie.....	1
1.2 Die systematische Stellung von <i>Gibberella fujikuroi</i>	2
1.3 Die Gibberelline.....	3
1.4 Die Gibberellin-Biosynthese.....	4
1.4.1 Phase I: Der Isoprenoid-Biosyntheseweg und die Bildung von <i>ent</i> -Kauren.....	4
1.4.2 Phase II: Vom <i>ent</i> -Kauren zum GA ₁₂ -Aldehyd.....	6
1.4.3 Phase III: Die Synthese biologisch aktiver Gibberelline.....	7
1.4.4 Kompartimentierung und Regulation der Gibberellin-Biosynthese.....	8
1.4.5 Deaktivierung der Gibberelline.....	10
1.5 Wege zur Isolierung von an der Gibberellin-Biosynthese beteiligter Gene.....	10
1.6 Das „Gencluster“ der Gibberellin-Biosynthese bei <i>G. fujikuroi</i>	12
1.7 Zielsetzung der Arbeit.....	13
2 Material und Methoden.....	14
2.1 Stämme.....	14
2.1.1 <i>Escherichia coli</i>	14
2.1.2 <i>Gibberella fujikuroi</i>	14
2.1.3 <i>Oryza sativa</i>	14
2.2 Plasmide.....	14
2.3 Primer.....	15
2.3.1 Sequenzierungs-Primer.....	15
2.3.2 Polymerase-Kettenreaktions(PCR)-Primer.....	15
2.4 Chemikalien.....	15
2.5 Enzyme.....	16
2.6 Medien.....	16
2.7 Molekulargenetische Arbeitsmethoden.....	17
2.7.1 Präparation von Nukleinsäuren.....	17
2.7.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	17
2.7.1.2 Isolierung von DNA aus λ -Phagen.....	17
2.7.1.3 Isolierung von genomischer DNA aus <i>G. fujikuroi</i>	17
2.7.1.4 RNA-Isolierung.....	18
2.7.2 Gelelektrophorese und Restriktion von Nukleinsäuren.....	18
2.7.2.1 Restriktion und Gelelektrophorese von DNA.....	18
2.7.2.2 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	19
2.7.2.3 RNA-Gelelektrophorese.....	19
2.7.2.4 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE).....	19

2.7.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	20
2.7.3.1 PCR mit genomischer DNA.....	20
2.7.3.2 RT-PCR.....	21
2.7.4 Transfer von Nukleinsäuren.....	21
2.7.4.1 Southern-Blot.....	21
2.7.4.2 Koloniefilter.....	21
2.7.4.3 Phagenplaquefilter.....	22
2.7.4.4 Northern Blot.....	22
2.7.5 Hybridisierung.....	22
2.7.5.1 Sondenvorbereitung.....	22
2.7.5.2 DNA/DNA-Hybridisierung.....	23
2.7.5.3 DNA/RNA-Hybridisierung.....	23
2.7.6 Sequenzierung von DNA.....	23
2.7.7 Transformation von <i>E. coli</i>	24
2.7.7.1 Klonierung von DNA-Fragmenten.....	24
2.7.7.2 „In vivo Excision“ von λ Uni-ZAP XR-Klonen.....	24
2.7.8 Transformation von <i>G. fujikuroi</i>	24
2.8 Dünnschichtchromatographie (DC).....	25
2.9 „High Pressure Liquid Chromatographie“ (HPLC).....	26
2.10 Reis-Biotest.....	26
3 Ergebnisse.....	27
3.1 Erzeugung und Analyse von Transformanten mit Störungen in der Gibberellin-Biosynthese.....	27
3.1.1 Transformation von <i>G. fujikuroi</i> mit pAN7-1.....	27
3.1.2 Bestimmung der Phänotypen der Transformanten.....	28
3.1.3 Analyse der Vektorintegrationen in den gib-Stämmen.....	30
3.1.4 Southern-Analyse der gib-Stämme.....	32
3.1.5 Chromosomenanalyse.....	35
3.1.5.1 Pulsfeld-Gelelektrophorese.....	35
3.1.5.2 Erstellung einer Chromosomenkarte.....	36
3.2 Sequenzanalyse flankierender Bereiche des „Genclusters“ der Gibberellin-Biosynthese.....	40
3.2.1 Subklonierung und Sequenzierung der 3'-Bereiche von <i>orf 3</i>	40
3.2.2 Das Aldehyddehydrogenase-Gen.....	41
3.2.3 Das Alkoholdehydrogenase-Gen.....	46
3.2.4 Das Ankyrinomänen-Gen.....	50
3.2.5 Das Membrantransporter-Gen.....	53
3.2.6 Ermittlung der cDNA-Sequenzen.....	56
3.2.7 Transkriptnachweise.....	57
3.3 Inaktivierung des <i>smt</i> -Gens durch „Gene Disruption“.....	59
3.3.1 Konstruktion des „Gene Disruption“-Vektors.....	59
3.3.2 Transformation von <i>G. fujikuroi</i> mit pSMTAUS.....	59
3.3.3 Analyse der Transformanten.....	62
3.4 „Chromosome Walking“.....	63

4 Diskussion.....	64
4.1 Deletionen des „Genclusters“ der Gibberellin-Biosynthese.....	64
4.2 Die Suche nach weiteren Genen des „Genclusters“ der Gibberellin-Biosynthese.....	69
4.2.1 Das Aldehyddehydrogenase-Gen.....	69
4.2.2 Das Alkoholdehydrogenase-Gen.....	73
4.2.3 Das Ankyrindomänen-Gen.....	77
4.2.4 Das Membrantransporter-Gen.....	78
4.2.5 Zusammenfassende Abschätzung.....	81
5 Zusammenfassung.....	84
6 Summary.....	85
7 Literatur.....	86
8 Anhang.....	101