INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGEN UND TABELLEN	IV	
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII	
1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Gerste	2
1.2	Die Netzfleckenkrankheit der Gerste	3
1.3	Bekämpfung von Mykosen an Getreide	5
1.4	Insertionsmutagenese	7
1.5	Der Lysin-Biosyntheseweg bei Pilzen	7
1.6	Lysin-Katabolismus	13
1.7	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	15
2	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	Material	16
2.1.1	Chemikalien, Enzyme und allgemeines Material	16
2.1.2	Organismen	17
2.1.2.1	Pflanzen	17
2.1.2.2	Bakterienstämme	17
2.1.2.3	Pilzisolat	17
2.1.2.4	Phagenbank	18
2.1.3	Oligonukleotide	18
2.1.4	Plasmide	20
2.1.5	Medien	23
2.2	Methoden	26
2.2.1	Kultivierung der Pflanzen	26
2.2.2	Kultivierung von <i>Pyrenophora teres</i>	26
2.2.3	Kultivierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	26
2.2.4	Lagerung von Bakterien und Pilzen	26
2.2.5	Konidiation und Gewinnung von Konidien	27
2.2.5.1	Vereinzelung von Konidien	27
2.2.6	Virulenztest	28
2.2.6.1	Detached Leaf Assay	28
2.2.6.2	Detached Leaf Assay mit Myzel	28
2.2.6.3	Adhäsionstest	29
2.2.7	Untersuchungen zur Promotoraktivität bei <i>P. teres</i> REMI-Transformanden	29
2.2.7.1	Nachweis von GUS-Aktivität bei <i>P. teres</i> REMI-Transformanden	30
2.2.7.2	Nachweis von LUC-Aktivität bei <i>P. teres</i> REMI-Transformanden	31
2.2.8	Protoplastierung von <i>P. teres</i>	31
2.2.9	Transformation von <i>P. teres</i> Protoplasten	32
2.2.10	Protoplastenregeneration und Selektion der Transformanden	33
2.2.11	Wachstumstest von <i>P. teres</i> -Transformanden auf Aminosäure-Mangelmedium	33
2.2.12	Molekularbiologische Methoden	33
2.2.12.1	Standardmethoden	33
2.2.12.2	DNA-Isolierung aus <i>P. teres</i>	34

2.2.12.3	RNA-Isolierung aus <i>P. teres</i>	34
2.2.12.4	Transformation von <i>E. coli</i>	34
2.2.12.5	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	34
2.2.12.5.1	Thermal Asymmetric Interlaced PCR (TAIL-PCR)	35
2.2.12.5.2	PCR mit degenerierten Primern zur Amplifikation des <i>LYS4</i> -Gens aus <i>P. teres</i>	36
2.2.12.5.3	RT-PCR	37
2.2.12.6	Klonierung von PCR-Produkten	38
2.2.12.7	Southern Blot – Transfer von Nukleinsäuren auf Membranfilter	38
2.2.12.7.1	Sondenmarkierung	39
2.2.12.7.2	Hybridisierung und Detektion	39
2.2.12.7.3	Screening einer genomischen Lambda-Bibliothek von <i>P. teres</i>	39
2.2.12.8	Sequenzierung	40
2.2.13	Proteinkonzentrationsbestimmung in Zellrohextrakt	40
2.2.14	Photometrische Aktivitätsbestimmung der Homoaconitase	40
2.2.15	Bearbeitung und Analyse von DNA- und Proteinsequenzen <i>in silico</i>	41
3	ERGEBNISSE	42
3.1	Screening von REMI-Transformanden	42
3.1.1	Untersuchung der Virulenz im Detached Leaf Assay	42
3.1.2	Untersuchung zur Promotoraktivität	42
3.1.3	Untersuchungen zur Aminosäureauxotrophie	43
3.2	Klonierung von REMI-Vektor flankierenden DNA-Bereichen aus <i>P. teres</i> Transformanden	47
3.2.1	REMI-Transformande #556	48
3.2.2	REMI-Transformande #564	52
3.2.3	REMI-Transformande #728	56
3.2.4	REMI-Transformande #951	61
3.3	Klonierung des Homoaconitasegens (<i>LYS4</i>) von <i>Pyrenophora teres</i>	64
3.3.1	Das <i>LYS4</i> -Gen von <i>P. teres</i>	65
3.3.2	Charakterisierung des Homoaconitase-Lambda-Fragments	69
3.4	Zerstörung des <i>LYS4</i> -Gens durch homologe Rekombination	70
3.4.1	Klonierung des Knockout-Vektors pAN7-1 KO HOM (1. Konstrukt) und Transformation von <i>P. teres</i>	71
3.4.2	Klonierung des Knockout-Vektors pAN7-1 KO HOM 500 (2. Konstrukt) und Transformation von <i>P. teres</i>	73
3.4.3	Klonierung des pGEMT-T/HOM/HPH mit der KO-HOM-Kassette (3. Konstrukt) und Transformation von <i>P. teres</i>	74
3.5	Charakterisierung der <i>lys4</i> -Transformanden	77
3.5.1	Untersuchungen zur Lysinauxotrophie	77
3.5.2	Southern Blot Analyse der <i>lys4</i> -Transformanden	79
3.5.2.1	Analyse der <i>lys4</i> -Transformanden mit dem 1. Konstrukt	79
3.5.2.2	Analyse der <i>lys4</i> -Transformanden mit dem 2. Konstrukt	80
3.5.2.3	Analyse der <i>lys4</i> -Transformanden mit dem 3. Konstrukt	81
3.5.3	Untersuchungen zur Virulenz der <i>lys4</i> -Transformanden	83
3.5.4	Überprüfung der <i>lys4</i> -Transformanden in der RT-PCR	84
3.5.4.1	<i>lys4</i> -Transformande #74 mit dem 1. Konstrukt	85
3.5.4.2	<i>lys4</i> -Transformanden mit dem 2. Konstrukt	86

3.5.4.3	<i>lys4</i> -Transformanden mit der KO-HOM-Kassette (3. Konstrukt)	88
3.5.5	Photometrische Aktivitätsbestimmung der Homoaconitase im Zellrohextrakt der <i>lys4</i> -Transformanden	89
3.5.6	Konidienmorphologie der <i>lys4</i> -Transformanden (3. Konstrukt)	91
4	DISKUSSION	92
4.1	Screening der REMI-Transformanden	92
4.1.1	Phänotypische Stabilität der REMI-Transformanden	94
4.2	Analysierte REMI-Transformanden von <i>P. teres</i>	96
4.2.1	Transformande #556	96
4.2.2	Transformande #564	97
4.2.3	Transformande #728	99
4.2.3.1	ORF1	99
4.2.3.2	ORF2	100
4.2.3.3	ORF3	101
4.2.4	Transformande #951	102
4.3	Das <i>LYS4</i> -Gen	103
4.3.1	Knockout Strategien für die Erzeugung lysinauxotropher Transformanden	107
4.3.2	Die <i>lys4</i> -Transformanden	110
4.3.2.1	Die Bedeutung der Homoaconitase für die Virulenz von <i>P. teres</i>	113
4.3.2.2	Die Bedeutung der Homoaconitase für die Konidiation von <i>P. teres</i>	115
4.4	Ausblick	116
5	ZUSAMMENFASSUNG	118
6	LITERATURVERZEICHNIS	120
7	ANHANG	137