

# Schlussbericht

der Forschungsstelle(n)

1. Westfälische Wilhelms-Universität Münster
2. Universität Stuttgart, Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik (IGVT)
3. Julius Kühn-Institut (JKI) BraunschweigNr.

zu dem über die



im Rahmen des Programms zur  
Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF)

vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie  
aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

geförderten Vorhaben **IGF 16001 N/1**

***Verfahrensentwicklung für die kostengünstige, selektive Produktion von Gibberellinen zur Ertragssteigerung von Energiepflanzen*** Thema des IGF-Vorhabens

(Bewilligungszeitraum: 01.04.2009-30.09.2012)

der AiF-Forschungsvereinigung

Dechema

Münster,  
Ort, Datum

Prof. Dr. Bettina Tudzynski

Name und Unterschrift des/der Projektleiter(s)  
an der/den Forschungsstelle(n)

Gefördert durch:



Bundesministerium  
für Wirtschaft  
und Technologie

aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages

## I. Forschungsstelle 1

### 1. Verwendung der Zuwendung und Ergebnisse im Berichtszeitraum

#### 1.1 Teilziel/Arbeitspaket 1

Im **Arbeitspaket 1** sollten folgende Arbeiten durchgeführt werden:

Auswahl eines geeigneten Produktionsstammes für die weitere gentechnische Optimierung durch HPLC Analyse der Gibberellinwerte und der Expressions-Level der Gibberellin-Gene  
Targeted Gene Replacement der Gene **des** bzw. **P450-3** in diesem ausgewählten Ausgangsstamm zur Herstellung von Pilzmutanten für die selektive Biosynthese der Gibberelline GA<sub>1</sub>, GA<sub>7</sub> bzw. GA<sub>4</sub>.

#### • **Verwendung der Zuwendung**

- Durchgeführte Arbeiten:  
Gentechnische Manipulation von *Fusarium fujikuroi* Pilzstämmen zur Steigerung der Gibberellinbildung; Expressionsstudien der Gibberellin Gene
- Dazu benötigt und eingesetzt:
  - wissenschaftlich-technisches Personal:  
(Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)  
**Frau Dr. C. Michielse** vom 01.6.2009-31.5.2012 (durch Schwangerschaft und Geburt zweier Kinder während der Laufzeit des Projekts zwischenzeitlich vertreten durch Dr. Philipp Wiemann als Schwangerschaftsvertretung)  
**Frau S. Albermann** (Doktorandin, ½ Stelle HPA A): vom 01.08.2009-31.07.2012.  
**Herr Dr. P. Wiemann (Schwangerschaftsvertretung)** vom 01.05.2010 bis 31.01. 2011 ; und vom 01.01.2012- 30.04.2012
  - Geräte:  
(Einzelansatz B des Finanzierungsplans)  
Als Geräte wurden das vom Projekt finanzierte **Fluoreszenzmikroskop und die hochauflösende Kamera** eingesetzt. Darüber hinaus benötigten wir alle üblichen Geräte für mikrobiologische Arbeiten wie Zentrifugen, PCR-Geräte, Gelelektrophoresen, Schüttler; HPLC Gerät.
  - Leistungen Dritter:  
(Einzelansatz C des Finanzierungsplans)  
die Leistungen Dritter (Microarrays) wurden im Arbeitspaket 1 noch nicht benötigt.

#### 2.1.1 Erzielte Ergebnisse

Die Aufgabe von Fo-St.1 im Rahmen dieses Projekts war die gezielte gentechnische Veränderung des Wildtyp-Stamms des filamentösen Pilzes *Fusarium fujikuroi* mit Hilfe von unterschiedlichen molekularbiologischen Methoden sowie die anschließende vergleichende Analyse der daraus entstandenen Mutanten im Hinblick auf eine erhöhte Gibberellinsynthese und auf ein verändertes Gibberellinspektrum, um neue Gibberelline (GA<sub>4</sub>; GA<sub>7</sub>) mit noch unbekannter Wirkung zu gewinnen (Abb. 1A).

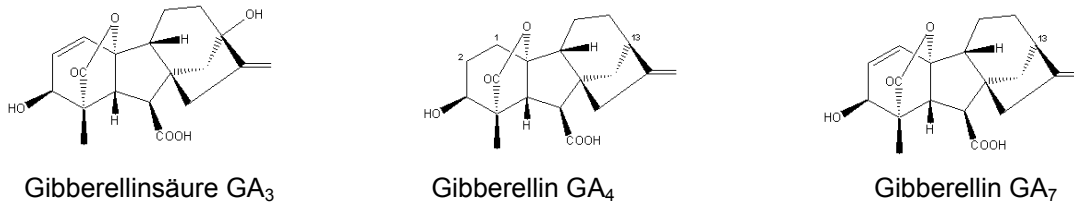
Die Fo-St.1 hatte zu Beginn des Projekts bereits zahlreiche Vorarbeiten durchgeführt. Es waren bereits erfolgreich alle Gene des GA-Biosyntheseweges identifiziert und ihre Funktion charakterisiert<sup>1</sup>. Alle erforderlichen genetischen und molekularbiologischen Techniken und Methoden wie Mutagenese, Transformation, Selektion, Expressionsstudien und mikroskopische Techniken waren etabliert.

<sup>1</sup>Bömke C, Tudzynski B (2009) Diversity, regulation, and evolution of the gibberellin biosynthetic pathway in fungi compared to plants and bacteria. *Phytochem* 70:1876–1893.

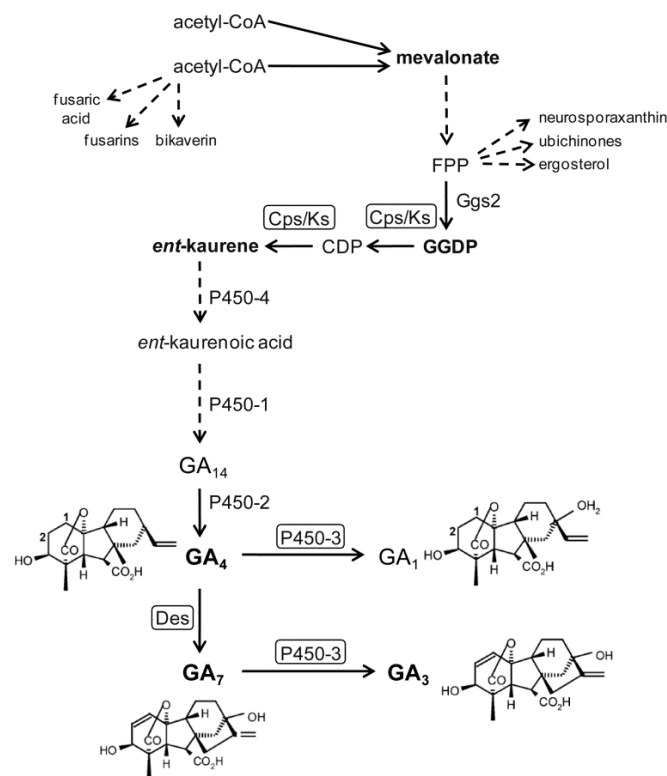
Anhand von Expressionsdaten und Gibberellinausbeuten wurde zunächst der beste Ausgangsstamm unter 25 getesteten *Fusarium fujikuroi* Stämmen für weitere gentechnische Arbeiten ausgewählt: der GA<sub>3</sub>-bildende Wildstamm *F. fujikuroi* m567.

Durch UV-Mutagenese wurde das Gen *P450-3* mutiert, so dass die Mutante 6314 aus m567 hervorging, der im Wesentlichen das Gibberellin GA<sub>7</sub> bildet (Abb. 1B). Der Stamm wurde als bester GA<sub>7</sub>-Bildner zu Beginn der Arbeiten an Fo-Stelle 2 übergeben, um sofort mit der Optimierung der Kultur- und Fermentationsbedingungen für die Gibberellinbiosynthese beginnen zu können.

**A**



**B**



**Abb. 1: Die Gibberellinbiosynthese bei *Fusarium fujikuroi*.** **A:** Strukturformeln der biologisch aktiven Gibberelline GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> und GA<sub>7</sub>. **B:** Schematische Darstellung des Isoprenoid-Biosynthesewegs und der letzten Schritte der Gibberellinbiosynthese, die Ziel der gentechnischen Manipulation im Projekt waren.

In Stamm 6314 wurde nun durch „Targeted Gene Replacement“ das Gen *des* ausgeschaltet, das für die Umwandlung von GA<sub>4</sub> in GA<sub>7</sub> verantwortlich ist (Abb. 1). Dadurch entstand der GA<sub>4</sub>-Bildner 6314Δ*des* (Doppelmutante). Stamm 6314 kann zur gezielten Produktion von GA<sub>7</sub>, Stamm 6314Δ*des* zur gezielten Produktion von GA<sub>4</sub> verwendet werden. Beide Mutanten standen sowohl für weitere gentechnische Veränderungen als auch für Fermentationen in Fo-Stelle 2 zur Verfügung.

## 1.2. Teilziel/Arbeitspaket 2

Im Arbeitspaket 2 sollten folgende Arbeiten durchgeführt werden:

- Weitere gentechnische Optimierung der Stämme 6314 und 6314 $\Delta$ des: durch Manipulation der frühen Isoprenoidgene sollte die Bereitstellung der Precursor (z.B. Mevalonat) für die Gibberellinbildung verbessert werden. Dies sollte durch Überexpression und Mutation von Genen des Mevalonat-Wegs erreicht werden.
- **Verwendung der Zuwendung**
  - Durchgeführte Arbeiten:  
Weitere gentechnische Manipulation von *Fusarium fujikuroi* Pilzstämmen zur Steigerung der Gibberellinbildung; Expressionsstudien der Gibberellinogene
  - Dazu benötigt und eingesetzt:
    - wissenschaftlich-technisches Personal:  
(Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)  
**Frau S. Albermann** (Doktorandin, ½ Stelle HPA A): vom 01.08.2009-31.07.2012.
    - Geräte:  
(Einzelansatz B des Finanzierungsplans)  
Als Geräte wurden das vom Projekt finanzierte Fluoreszenzmikroskop und die hochauflösende Kamera eingesetzt. Darüber hinaus benötigten wir alle üblichen Geräte für mikrobiologische Arbeiten wie Zentrifugen, PCR-Geräte, Gelelektrophoresen, Schüttler; HPLC-Gerät.
    - Leistungen Dritter:  
(Einzelansatz C des Finanzierungsplans)  
die Leistungen Dritter (Microarrays) wurden im Arbeitspaket 2 noch nicht benötigt.

### 2.1.1 Erzielte Ergebnisse

**Frau Albermann** war im Projekt vorrangig für die Optimierung der Pilzstämmen durch genetische Manipulation der Biosynthesegene verantwortlich und hat Arbeitspaket 2 bearbeitet.

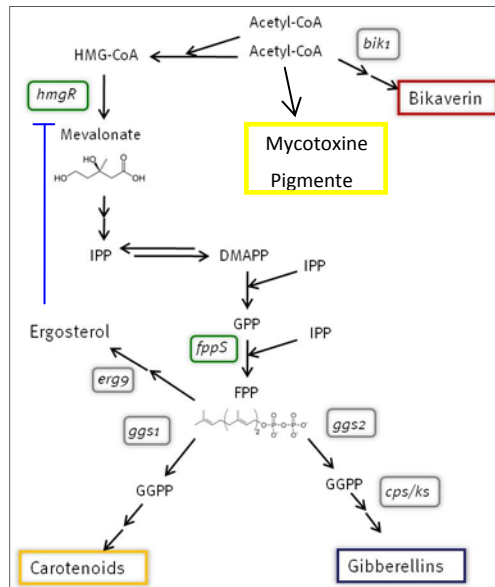
Da vorherige Arbeiten zu Beginn des Projekts gezeigt haben, dass die alleinige Überexpression dieser GA-Biosynthesegene lediglich zu einer geringfügig erhöhten GA-Ausbeute führen, wurde der Schwerpunkt der Arbeit zunächst auf die erhöhte Bereitstellung von Vorstufen der GA-Produktion gelegt. Da GAs Isoprenoide sind, beginnt der Biosyntheseweg mit der Synthese von Mevalonat durch die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reduktase (HmgR). Weitere Schlüsselenzyme sind die Farnesylpyrophosphatsynthase (FppS) und die Geranylgeranylpyrophosphatsynthase 2 (Ggs2), die die Synthese von Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) katalysieren (Abb. 1).

Es wurden erfolgreich Vektoren für die Überexpression der FPP-Synthase (pOE:*fpp*) und des HmgR-kodierenden Gens pOE:*hmgR* kloniert und zunächst in den Wildstamm von *F. fujikuroi* transformiert. Während die Überexpression des *fppS*-Gens eine leichte Erhöhung der Expression der GA-Gene zur Folge hatte, trat das Gegenteil bei der Überexpression des *hmgR*-Gens auf: Der erhöhte Expressionslevel dieses Gens führte zu einer verringerten Expression der GA-Gene. Die Erklärung dieses Phänomens liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Feed-back-Regulation der HMGR begründet<sup>2</sup>. Ein solcher Regulationsmechanismus ist in einigen Modellorganismen, wie *Saccharomyces cerevisiae*, bereits beschrieben. Bei Hefen wurde gezeigt, dass die Aktivität des Schlüsselenzyms des Isoprenoid-Wegs, der HmgR, auf Transkriptions- und Proteinlevel (Phosphorylierung, Ubiquitinierung; s. Abb. 2) strikt reguliert wird<sup>3</sup>. Für *F. fujikuroi* würde das

<sup>2</sup> DeBose-Boyd RA (2008) Feedback regulation of cholesterol synthesis: sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase. Cell Research 18:609-621.

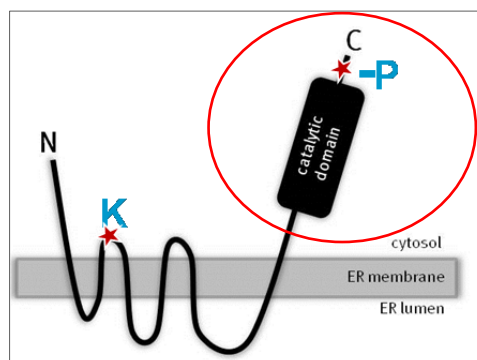
<sup>3</sup> Bien CM, Espenshade PJ (2010) Sterol Regulatory Element Binding Proteins in Fungi: Hypoxic Transcription Factors Linked to Pathogenesis. Eucaryotic Cell, Mar. p. 352-359.

bedeuten, dass das durch die Überexpression vermehrt gebildete Ergosterol oder Vorstufen die Aktivität der HMGR drosseln könnten. Die verringerte Aktivität der HmgR könnte dann aber zu einer verringerten Biosynthese von Gibberellinen führen, da nicht genug Vorstufen wie Mevalonat gebildet werden.



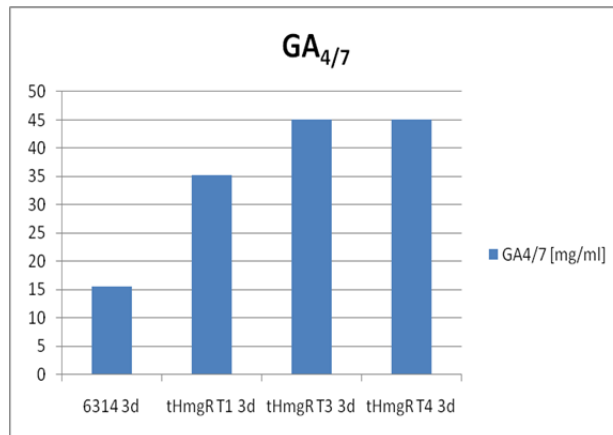
**Abb. 2:** Schematische Darstellung des Isoprenoidsynthesewegs in *F. fujikuroi*. Die beiden Schlüsselenzyme HmgR und FppS sind hervorgehoben (grün), ebenso wie die relevanten Sekundärmetabolite Bikaverin (rot), Carotinoide (gelb) und Gibberelline (blau). Ergosterol führt vermutlich zu einer Feedback-Inhibition der HmgR.

Um diese Feed-back Regulation, die bisher nicht bei Hyphenpilzen untersucht wurde, zu umgehen, sollte durch die Entfernung der für die Feedback-Regulation verantwortlichen Transmembrandomänen der HmgR und der Überexpression der verbleibenden katalytischen Domäne am C-Terminus der HmgR aus *F. fujikuroi* eine verstärkte konstitutive Synthese von Mevalonat, und damit eine erhöhte Gibberellinproduktion erreicht werden (Abb. 3).



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der HmgR in *F. fujikuroi* mit Lokalisierung einer putativen Ubiquitylierungsstelle (blaues K) und potentieller Phosphorylierungsstelle (blaues P). Katalytische Domäne der HmgR. Rote Sternchen weisen auf Aminosäuren hin, die mutiert werden sollen.

Durch diese Verkürzung des *hmgR* (truncated HmgR; *thmgR*) Gens konnte die GA-Produktion der Mutanten tatsächlich im Durchschnitt um das drei-fache gesteigert werden. Die Ergebnisse wurden sowohl mit Hilfe von HPLC-Analysen (s. Abb. 4) als auch durch Dünnschichtchromatographie bestätigt.



**Abb. 4:** HPLC-Analyse der GA<sub>4/7</sub>-Produktion (Gesamtmenge von GA<sub>4</sub> und GA<sub>7</sub>) des Ausgangsstamms 6314 im Vergleich zu drei unabhängigen Mutanten, deren Transmembrandomäne entfernt wurde (tHmgR), nach drei Tagen in 10 % ICI-Medium<sup>4</sup>.

Die Stämme wurden an Forschungsstelle 2 übergeben.

## 2.2 Teilziel/Arbeitspaket 3

Im **Arbeitspaket 3** sollten folgende Arbeiten durchgeführt werden:

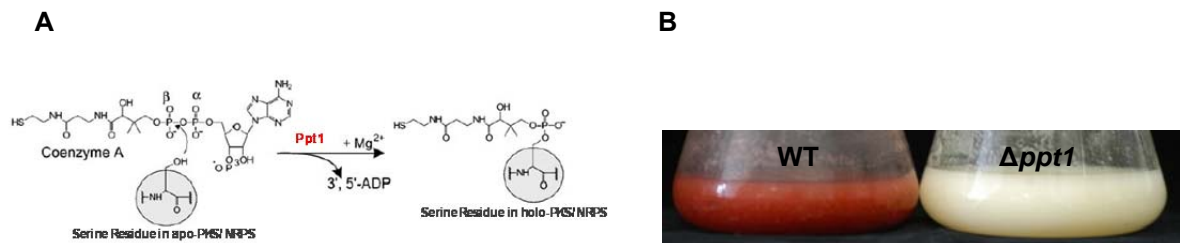
- Ausschaltung von konkurrierenden Seitenwegen der Gibberellinbiosynthese durch die Deletion des Phosphopantetheinyl-Transferase-kodierenden Gens (*ppt1*), das essentiell für die posttranslationale Aktivierung aller nicht-ribosomaler Peptid-Synthasen (NRPS) sowie aller Polyketidsynthasen (PKS) ist.
- **Verwendung der Zuwendung**
  - Durchgeführte Arbeiten:
    - Gene Replacement des *ppt1* Gens. Analyse der Mutanten auf Genexpression und Gibberellinproduktionstechnische Manipulation von *Fusarium fujikuroi* Pilzstämmen zur Steigerung der Gibberellinbildung; Expressionsstudien der Gibberellingene; Messung aller bekannten Sekundärmetabolite wie Mycotoxine und Pigmente.
  - Dazu benötigt und eingesetzt:
    - wissenschaftlich-technisches Personal:  
(Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)  
**Herr Dr. P. Wiemann** (Schwangerschaftsvertretung) vom 01.05.2010 bis 31.01. 2011 ; und vom 01.01.2012- 30.04.2012  
**Frau S. Albermann** (Doktorandin, ½ Stelle HPA A): vom 01.08.2009-31.07.2012.
    - Geräte:  
(Einzelansatz B des Finanzierungsplans)  
Als Geräte wurden das vom Projekt finanzierte Fluoreszenzmikroskop und die hochauflösende Kamera eingesetzt. Darüber hinaus benötigten wir alle üblichen Geräte für mikrobiologische Arbeiten wie Zentrifugen, PCR-Geräte, Gelelektrophoresen, Schüttler; HPLC Gerät.
    - Leistungen Dritter:  
(Einzelansatz C des Finanzierungsplans)  
die Leistungen Dritter (Microarrays) wurden im Arbeitspaket 3 noch nicht benötigt.

<sup>4</sup> Geissman TA, Verbiscar AJ, Phinney BO, Cragg G (1966) Studies on the biosynthesis of gibberellins from (-)-kaurenoic acid in cultures of *Gibberella fujikuroi*. Phytochem 5:933-947.

## 2.2.1 Erzielte Ergebnisse

Um zu verhindern, dass Vorstufen des GA-Biosynthesewegs für Prozesse verwendet werden, die für den Pilz nicht essentiell sind (Mycotoxine; Pigmente), sollten Nebenwege, die um Acetyl-CoA konkurrieren, herunterreguliert werden.

Acetyl-CoA stellt einen gemeinsamen Ausgangsstoff für verschiedene Metaboliten dar (s. Abb. 2). So wird beispielsweise der rote Farbstoff Bikaverin unter denselben Bedingungen wie die Gibberelline gebildet<sup>5</sup>. Die Synthese beider Verbindungen wird durch Stickstoffmangel und saure pH-Werte begünstigt. Ein zusätzliches Problem stellt das rote Pigment bei der späteren Aufreinigung der Gibberelline dar. Um dies zu umgehen, wurde die Phosphopantetheinyl-Transferase Ppt1 in *F. fujikuroi* ausgeschaltet. Dieser gentechnische Schritt ermöglicht eine gleichzeitige Abschaltung aller PKS- und NRPS-basierten Produkte<sup>6</sup>. Ppt1 sorgt dafür, dass der CoA-Rest von Acetyl-CoA an einen Serin-Rest des apo-Enzyms (NRPS oder PKS) kovalent gebunden wird, so dass durch diese Reaktion ein funktionsfähiges holo-Enzym entsteht<sup>7</sup> (s. Abb. 5A). Eine Ausschaltung von *ppt1* bewirkt also, dass viele Synthesewege, die mit dem Isoprenoidweg um den Ausgangsstoff Acetyl-CoA konkurrieren, wegfallen, während Terpene wie die Gibberelline nicht betroffen sind. Zudem synthetisiert *F. fujikuroi* dann keine störenden Pigmente wie Bikaverin oder Fusarubin mehr, die bei der Aufarbeitung der Gibberelline große Probleme machen. Auch der Wegfall hochtoxischer Mykotoxine ist ein großer Vorteil für industriell gefertigte Gibberellin-Präparate.



**Abb. 5** **A:** Reaktionsmechanismus der Phosphopantetheinyl-Transferase Ppt1 (verändert nach<sup>8</sup>). Ppt1 katalysiert die kovalente Bindung des CoA-Rests von Acetyl-CoA an einen Serin-Rest des apo-Enzyms. **B:** Wegfall störender Pigmente in der *ppt1* Deletionsmutante.

Die Deletionsmutanten  $\Delta ppt1$  im GA<sub>3</sub>-produzierenden Ausgangsstamm produzierten durchschnittlich 1,4-fach mehr Gibberelline. Daraufhin wurde *ppt1* auch im GA<sub>7</sub>-produzierenden Stamm 6314 ausgeschaltet. Die erhaltenen Mutanten produzieren mehr Gibberelline und sind völlig pigmentfrei (Abb. 5B). Die Ergebnisse dieser Arbeiten wurden bereits erfolgreich publiziert (Paper „The Sfp-type 4'-phosphopantetheinyl transferase Ppt1 determines secondary metabolite fate and development in *Fusarium fujikuroi*“ von Wiemann, P., Albermann, S., Niehaus, E.-M. *et al.*, PLOS One, 2012 und das bei Appl. Environm. Microbiol. eingereichte Paper “Production and application of specific gibberellins obtained by different wild-type strains and novel mutants of *Fusarium fujikuroi*.” von Albermann, S., Elter, T., Koltermann, D., Teubner, A., Krischke, W., Hirth, T., Rühl, G., and Tudzynski, B. Submitted 30.10.2012).

## 2.3 Teilziel/Arbeitspaket 4

Im **Arbeitspaket 4** stand die Untersuchung der Regulation der GA Biosynthese im Mittelpunkt: Die Rolle der globalen Transkriptionsfaktoren AreA und AreB bei der Regulation der GA Biosynthese.

<sup>5</sup> Wiemann P, Willmann A, Straeten M, Kleigrew K, Beyer M, Humpf HU, Tudzynski B (2009) Biosynthesis of the red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi*: genes, their function and regulation. *Mol Microbiol* 72 (4):931–46.

<sup>6</sup> García-Estrada C, Ullán RV, Velasco-Conde T, Godio, RP, Teixeira F, et al. (2008) Post-translational enzyme modification by the phosphopantetheinyl transferase is required for lysine and penicillin biosynthesis but not for roquefortine or fatty acid formation in *Penicillium chrysogenum*. 415: 317–324.

<sup>7,8</sup> Döhren, von, H. (2004): Biochemistry and General Genetics of Nonribosomal Peptide Synthetases in Fungi. *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.*, 88: 217–264.

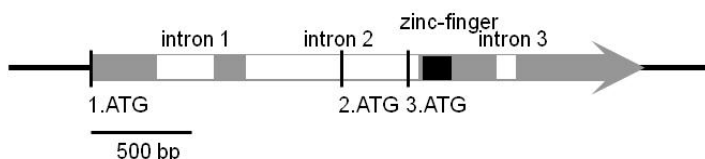
- **Verwendung der Zuwendung**

- Durchgeführte Arbeiten:  
Die Rolle der globalen Transkriptionsfaktoren AreA und AreB bei der Regulation der GA Biosynthese
- Dazu benötigt und eingesetzt:
  - wissenschaftlich-technisches Personal:  
(Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)  
**Frau Dr. C. Michielse** vom 01.6.2009-31.5.2012  
  
**Herrn Dr. P. Wiemann** (Schwangerschaftsvertretung) vom 01.05.2010 bis 31.01. 2011 ;  
und vom 01.01.2012- 30.04.2012
  - Geräte:  
(Einzelansatz B des Finanzierungsplans)  
Als Geräte wurden das vom Projekt finanzierte Fluoreszenzmikroskop und die hochauflösende Kamera eingesetzt. Darüber hinaus benötigten wir alle üblichen Geräte für mikrobiologische Arbeiten wie Zentrifugen, PCR-Geräte, Gelelektrophoresen, Schüttler; HPLC Gerät.
  - Leistungen Dritter:  
(Einzelansatz C des Finanzierungsplans)  
Für dieses Arbeitspaket 4 wurden die Leistungen Dritter (Microarrays) in Anspruch genommen.

### 2.3.1 Erzielte Ergebnisse

Neben Strukturgenen sind insbesondere die Regulatoren für die Sekundärstoffsynthese verantwortlich. Dazu gehören im Falle der GA Biosynthese verschiedene Stickstoffregulatoren (z.B. AreA), da die GA Biosynthesegene durch Stickstoff reprimiert werden. Beide Transkriptionsfaktoren sind für die GA-Biosynthese essentiell<sup>9,10</sup>. Die gentechnische Manipulation dieser essentiellen Transkriptionsfaktoren gehörte zum Arbeitsgebiet von Frau Dr. Michielse bzw. - in der Schwangerschaftspause - von Dr. Philipp Wiemann.

Neben AreA hat der Pilz einen zweiten GATA-Transkriptionsfaktor, AreB, der ebenfalls in die Stickstoffregulation involviert ist. Im Rahmen des Projekts wurde die Rolle dieses Transkriptionsfaktors AreB bei der Regulation der GA Biosynthese weiter untersucht. Durch Genausschaltung konnte erstmals festgestellt werden, dass nicht nur AreA, sondern auch AreB essentiell für die Gibberellinbildung ist. Damit erschien es notwendig, die Regulation dieses Transkriptionsfaktors näher zu untersuchen.



**Abbildung 6:** Intron und Exon Struktur des areB Gens. Die drei Startkodonen sind einzeichnet und markiert als 1. 2. und 3. ATG.

Zunächst wurde die transkriptionelle Regulation dieses Gens analysiert. Mit Hilfe der Technik 5' RACE PCR wurde festgestellt, dass der *areB* Lokus für drei verschiedene Transkripte kodiert (Abb. 6). Genausschaltung konnte erstmals festgestellt werden, dass nicht nur AreA, sondern auch AreB essentiell für die Gibberellinbildung ist.

<sup>9</sup> Schönig B, Brown DW, Oeser B, Tudzynski B. 2008. Cross-species hybridization with *Fusarium verticillioides* microarrays reveals new insights in *Fusarium fujikuroi* nitrogen regulation and the role of AreA and NMR. Eukaryot. Cell 7:1831-1846.

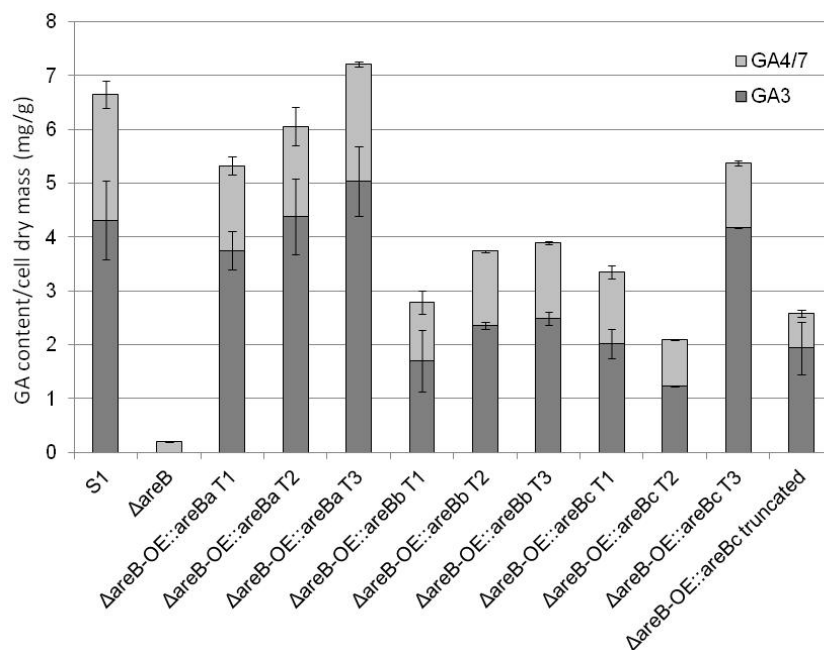
<sup>10</sup> Bömke C, Tudzynski B (2009) Diversity, regulation, and evolution of the gibberellin biosynthetic pathway in fungi compared to plants and bacteria. Phytochem 70:1876–1893.



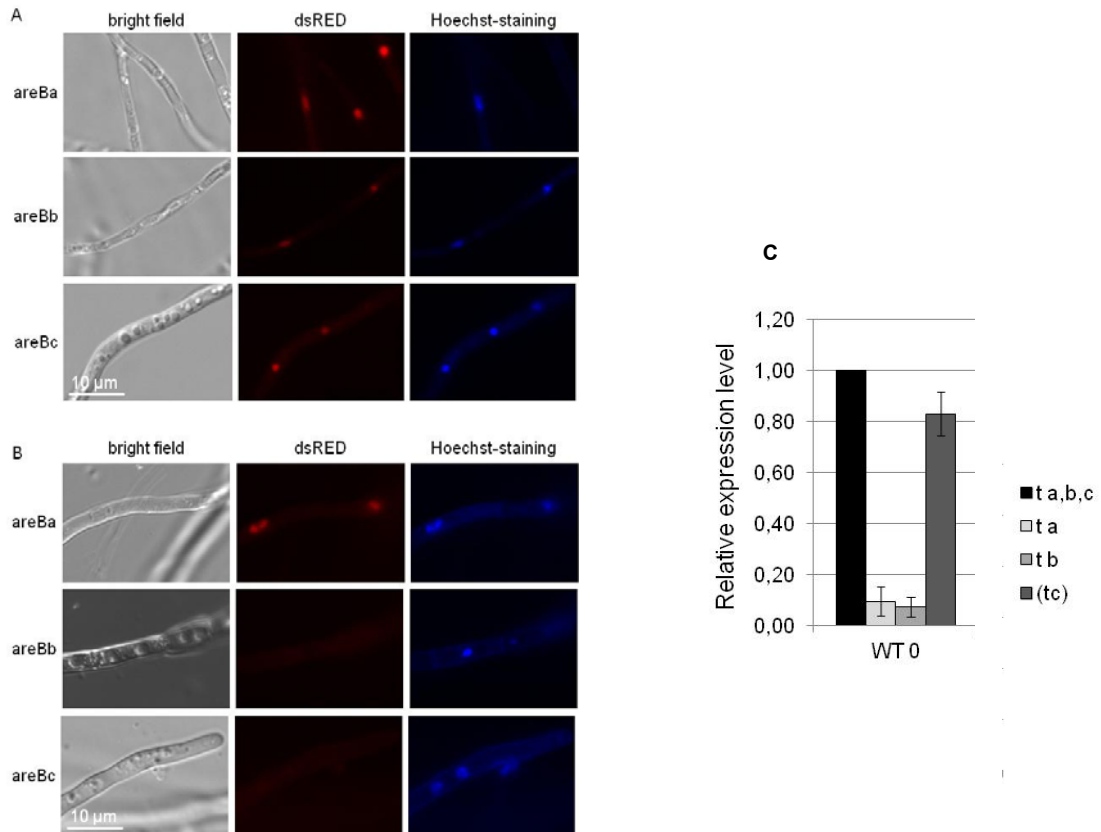
.Diese drei verschiedenen Transkripte – genannt *areBa*, *areBb* und *areBc* - wurden kloniert und ihre Funktionalität durch Expression aller drei Transkripte in der *areB* Deletionsmutante analysiert. Es zeigte sich, dass alle drei Transkripte für funktionale Proteine kodieren, da sie alle drei das normale Wachstum und eine Wildtyp-ähnliche GA Produktion wieder herstellen (Abb. 7).

Mikroskopische Studien mit Hilfe des aus Projektmitteln angeschafften Fluoreszenzmikroskops und der hochauflösenden Kamera zeigten, dass die drei AreB Proteine bei Stickstoffmangel im Zellkern lokalisiert sind, während bei Stickstoff-Überfluss nur AreBa im Kern bleibt. Die beiden andere AreB Proteine - AreBb und AreBc – sind dann mit schwacher Expression im Zytoplasma zu sehen (Abb. 8A,B). Mittels quantitativer Real-Time PCR hat sich herausgestellt, dass *areBc* das AreB Hauptprodukt kodiert (Abb 8C).

Da nun zwei generelle Transkriptionsfaktoren als absolut essentiell für die GA Biosynthese ermittelt worden sind, sollte der funktionale Zusammenhang zwischen diesen Transkriptionsfaktoren AreA und AreB mittels Ko-Lokalisationsstudien (AreA-GFP; AreB-DsRed) und Real-Time PCR untersucht werden. Beide Regulatoren wandern unter Stickstoffmangel, also optimalen GA-Produktionsbedingungen, in den Zellkern ein (Abb. 9A).

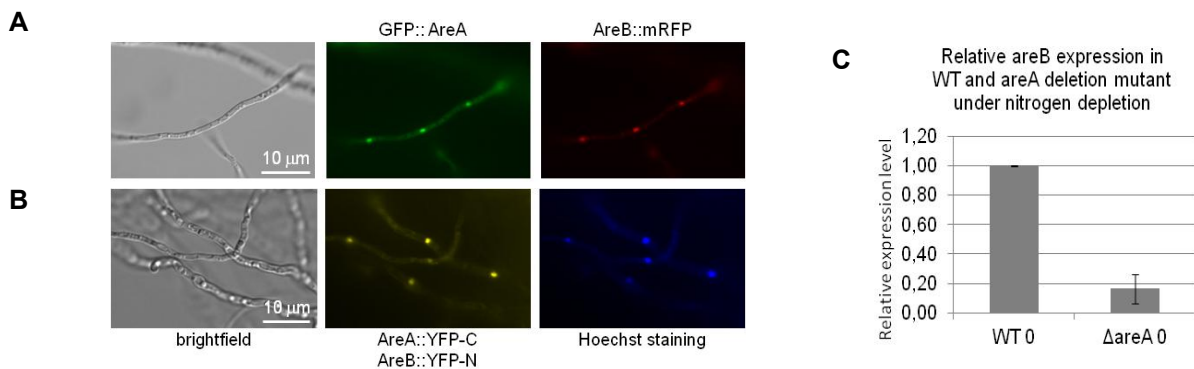


**Abb. 7:** GA-Produktion der *areB* Deletionsmutante und der Transformanten, die mit den drei verschiedenen *areB* Transkripten komplementiert wurden. Die HPLC-Analyse zeigt, dass alle Mutanten wieder in der Lage sind GAs zu produzieren.



**Abb. 8** Kernlokalisierung der drei Varianten des Transkriptionsfaktors AreB (Mitte, mit DsRed fusioniert) unter **A**) Stickstoffmangel (entspricht Gibberellin-bildenden Bedingungen) und unter **B**) Stickstoffüberschuss. Man sieht stark leuchtend die im Kern lokalisierten AreB Proteine und schwach leuchtend die Pilzhyphen. Als Kontrolle sind die Kerne angefärbt mit einer Kernfärbung (rechts, blaue Hoechst-Färbung). **C**) Real time PCR zur Quantifizierung der *areB* Transkripte: *areBc* ist am meisten exprimiert

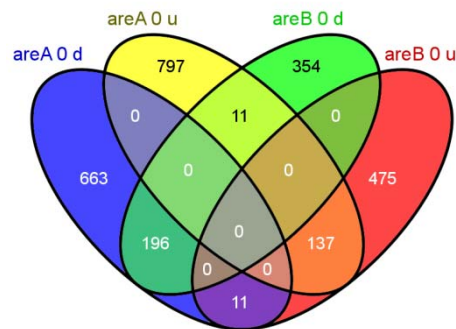
Weitere Analysen haben gezeigt, dass AreA mit AreBa, nicht aber mit AreBc, unter Stickstoffmangelbedingungen im Zellkern miteinander interagieren, was bisher generell bei Pilzen noch nicht bekannt war (Abb. 10B). Mittels Real-Time PCR ist außerdem festgestellt worden, daß *areB* Expression *areA* abhängig ist (Abb. 9C).



**Abb. 9: A)** Kernlokalisierung der beiden Transkriptionsfaktoren AreA (oben, mitte, mit GFP fusioniert) und AreB (oben, rechts, mit DsRed fusioniert) unter Gibberellin-bildenden Bedingungen. Man sieht schwach leuchtend die Pilzhyphen, stark leuchtend die im Kern lokalisierten Regulatoren AreA und AreB. **B)** Interaktion zwischen AreA und AreB (unten, mitte). Bei einer Interaktion leuchten die Kerne gelb auf. Als Kontrolle sind die Kerne angefärbt mit einer Kernfärbung (rechts, Hoechst). **C)** AreB Expression ist *areA* abhängig. In der *areA* Mutante (zweite Säule) ist der *areB* expression 5-fach runter im Vergleich zum Wildtyp.

Im Oktober 2011 konnten wir erstmals vergleichende Microarrays zwischen Wildstamm und *AreA* und *AreB* Mutanten durchführen. Alle Stämme wurden unter Gibberellin-induzierenden Stickstoffmangelbedingungen kultiviert, RNA isoliert und die Proben an Arrows Biomedical (Münster) übergeben, die als Serviceleistung (Leistung Dritter) die Hybridisierung der Chips durchführten. Diese Daten verschaffen uns einen Gesamtüberblick, welche Gene neben den GA-Genen noch unter Kontrolle der beiden Transkriptionsfaktoren *AreA* und *AreB* stehen. Insgesamt sind in der *AreA* und

AreB Mutante 870 und 561 Gene im Vergleich zum Wildtyp runterreguliert. Dagegen sind 945 und 623 Gene unter diesen Bedingungen im Vergleich zum Wildtyp hochreguliert. Das Venn-Diagramm zeigt die Verteilung dieser differentiell regulierten Gene zwischen den beiden Mutanten (Abb. 10).



**Abb. 10:** Verteilung der differentiell regulierten Gene in der *areA* und *areB* Mutante unter Stickstoffmangel wiedergegeben in einem Venn-Diagramm.

Sogenannte Anreicherungsanalysen haben gezeigt, dass neben den bekannten *areA* Zielgenen der GA Biosynthese vor allem Gene von AreA und AreB reguliert werden, die in Transport und Aminosäure Stoffwechsel involviert sind. Interessant ist das Ergebnis, dass die beiden GATA Transkriptionsfaktoren, AreA und AreB, die Expression weiterer Transkriptionsfaktoren beeinflussen können. In den Microarray-Analysen konnten wir 112 AreA-regulierte und 72 AreB-regulierte Transkriptionsfaktoren finden, wovon 11 Transkriptionsfaktoren sowohl durch AreA als auch AreB reguliert werden. Diese Transkriptionsfaktoren sind für weitere Analysen sehr interessant, da sie eventuell in die Regulation der GA-Gene mit involviert sein können.

## II Forschungsstelle 2

### 1. Verwendung der Zuwendung und Ergebnisse im Berichtszeitraum

#### 1.1 Teilziel/Arbeitspaket 1

- **Verwendung der Zuwendung**

- Durchgeführte Arbeiten:  
Erarbeitung der Vorkultivierungsbedingungen für die Pilzmutanten und Laborfermentationsversuche gemäß vergleichbarer Vorschriften aus Patenten. Fermentationen der neuen transgenen Pilzkulturen in verschiedenen Bioreaktoren.
- Dazu benötigt und eingesetzt:
  - wissenschaftlich-technisches Personal:  
(Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)  
**Herr Tino Elter** (01.07.2009 bis 30.09.2012, ½ Stelle HPA A)  
**Herr Jan-Michael Blum** (01.04.-30.06.11 HiWi)  
**Herr Dipl.-Ing FH Christian Bringmann** (01.01.-28.02.10 HiWi, 01.05.10 – 31.03.12 2/3 Stelle HPA B)
  - Geräte:  
(Einzelansatz B des Finanzierungsplans)  
Eingesetzt wurde der über das Projekt beschaffte Feststofffermenter von der Firma Prophyta.
  - Leistungen Dritter:  
(Einzelansatz C des Finanzierungsplans)  
Die folgenden analytischen Leistungen wurden vom Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik in Stuttgart in Anspruch genommen:  
Messung von Ammonium und Nitrat
    - Trockengewichtsbestimmung
    - Messung der Gibberellinkonzentration mittels HPLC
    - Messung der Gibberellinkonzentration mittels HPLC
    - Messung der Konzentration von org. Säuren und Zuckern mittels HPLC

### 2.1 Erzielte Ergebnisse

#### 2.1.1 Erarbeitung der Vorkultivierungsbedingungen

Für die Vorkultur wurde das Verfahren von Darken<sup>11</sup> verwendet, da dies bereits bei Fo-St. 1 erfolgreich verwendet wurde. Die Dauer der Vorkultur hatte keinen Einfluss auf das Ergebnis der Hauptkultur. Es stellte sich heraus, dass die Morphologie des Pilzes entscheidend die GA-Bildung beeinflusst, wobei Pelletbildung sich als äußerst ungünstig herausstellte. Daher wurde die Vorkultur nur noch mit einer Sporensuspension angeimpft und vor der Überführung in die Hauptkultur mit einem Mixer zerkleinert.

Für die Hauptkultur wurden verschiedene Medienzusammensetzungen erprobt. Es stellte sich allerdings kein signifikanter Vorteil eines Mediums heraus. Es wurde sich schließlich für das sogenannte ICI-Medium<sup>12</sup> entschieden. Da es sich hierbei um ein synthetisches Medium handelt, ist seine Zusammensetzung vollkommen bekannt. Im Vergleich mit komplexen Medien<sup>13 14</sup>, wo z.B.. Melasse, Pflanzenöl oder Maisquellwasser zugegeben wird, zeigen synthetische Medien eine bessere Reproduzierbarkeit. Daher und weil komplexe Bestandteile die Deutung der Ergebnisse sehr erschweren, wurde auf undefinierte Zugaben verzichtet.

Es stellte sich heraus, dass der pH-Wert eine der wichtigsten Einflussgrößen auf die GA-Produktion ist (Siehe Arbeitspaket 3). Da im Schüttelkolben eine Regelung des pH unmöglich ist,

<sup>11</sup> Marjorie A. Darken, A. L. Jensen, und P. Shu, „Production of Gibberellic Acid by Fermentation“, *Applied Microbiology* 7, Nr. 5 (September 1959): 301–303.

<sup>12</sup> T.A. Geissman u. a., „Studies on the biosynthesis of gibberellins from (-)-kaurenoic acid in cultures of *Gibberella fujikuroi*“, *Phytochemistry* 5, Nr. 5 (September 1966): 933–947.

<sup>13</sup> P.K.R. Kumar und B.K. Lonsane, „Microbial Production of Gibberellins: State of the Art“, Bd. Volume 34 (Academic Press, 1989), 29–139

<sup>14</sup> Bettina Brückner und Dieter Blechschmidt, „The Gibberellin Fermentation“, *Critical Reviews in Biotechnology* 11, Nr. 2 (Januar 1991): 163–192.

eignen sich Schüttelkolbenexperimente nur bedingt für die Medienoptimierung. So beeinflusst die Wahl der Stickstoffquelle den Verlauf des pH-Wertes. Diese Experimente mussten folglich im Bioreaktor durchgeführt werden, wo der pH-Wert geregelt werden kann.

### 2.1.2 Fermentationen der transgenen Pilzkulturen in verschiedenen Bioreaktoren

Bei der Kultur im Fermenter muss darauf geachtet werden, dass der Pilz nicht in Pelletform wächst. Es wurden die Reaktortypen Rührkessel, Blasensäule, Airlift-Schlaufenreaktor und Feststofffermenter untersucht.

In der Blasensäule und dem Schlaufenreaktor neigte der Pilz zu starker Pelletbildung und produzierte keinerlei Gibberellin.

Im Rührkesselreaktor neigt die Kultur zu Pelletbildung, Wandwachstum und Schaumbildung. Um dies zu vermeiden, wurde mit unterschiedlichen Rührertypen und Formen der Gaszufuhr experimentiert. Als bester Rührer stellte sich die Rushton-Turbine heraus, die aufgrund ihrer hohen Scherkraft das Myzel kurz und homogen hält. Die Begasung hatte den größten Einfluss auf die Schaumbildung, welche völlig vermieden werden kann, wenn anfänglich über den Kopfraum begast wurde. Ohne Schaumbildung konnte auch das Wandwachstum stark reduziert werden. Für die Produktion von GA im Flüssig-Fermenter hatte die Wahl der Stickstoffquelle keine Bedeutung. Es wurde daher nur Ammonium verwendet, da dessen Bestimmung weniger kostspielig ist als die Messung von Ammoniumnitrat. Da die Aufnahme von Ammonium den pH-Wert absenkt und dieser über die Zugabe von Base konstant gehalten wird, ist das Basevolumen ein gutes Maß zur Verfolgung der Fermentation. Die Produktion von GA<sub>7</sub> verhielt sich nicht linear und näherte sich mit zunehmender Zeit einem Grenzwert an. Daher wurde untersucht, ob eine Produktinhibierung durch GA<sub>7</sub> besteht, was nicht der Fall war.

Anders als in der Submers- war die GA<sub>7</sub>-Produktion in der Oberflächenkultur linear und zeigte innerhalb von zwei Wochen keine Verminderung der Produktivität. Allerdings produziert der Pilz im Feststofffermenter ca. 40% langsamer als in Flüssigkultur. Die Produktivität hing stark vom Substrat ab, wobei die höchste Produktivität auf Triticale erreicht wurde. Der Feststofffermenter stellte sich als ungeeignet zur Produktion von GA<sub>7</sub> heraus, da stets auch GA<sub>4</sub> produziert wurde (je nach Substrat bis zu 50 % der Gesamtmenge an GA). Da GA<sub>4</sub> die Vorstufe von sowohl GA<sub>7</sub> als auch GA<sub>1</sub> ist, ist dieses Verfahren wahrscheinlich ebenso ungeeignet für die Produktion von GA<sub>1</sub>. Eine wichtige Stammoptimierung betrifft die Ausschaltung des Gens *ppt1*, wodurch der Pilz weniger Nebenprodukte produziert. Ein Nebeneffekt dessen ist eine Abhängigkeit von der Aminosäure Lysin. Da eine Zufuhr von Lysin zum Feststofffermenter technisch schwierig ist, konnten diese vielversprechenden Stämme nicht emers kultiviert werden. Der Feststofffermenter stellt eine günstige Alternative zur Flüssigkultur dar, da hierbei der Arbeitsaufwand, Substratkosten und Energieverbrauch geringer sind. Nachteile dieses Reaktortyps liegen vor allem darin, dass die Fermentationsbedingungen nicht so genau einstellbar sind wie in der Submerskultur, wodurch die Ergebnisse der Fermentation sehr stark schwanken.

## 2.2 Teilziel/Arbeitspaket 2

- **Verwendung der Zuwendung**
- Durchgeführte Arbeiten
  - Untersuchung des Zerfallsverhaltens der spezifischen Gibberelline. Übertragung der Fermentationsbedingungen in Abhängigkeit des Produktionsstammes bzw. des Ziel-Gibberellins.
- Dazu benötigt und eingesetzt:
  - wissenschaftlich-technisches Personal:  
(Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)  
  
**Herr Tino Elter** (01.07.2009 bis 30.09.2012, ½ Stelle HPA A)  
**Herr Andreas Teubner** (15.09.2011 bis 31.03.2012 HiWi)
  - Leistungen Dritter:  
(Einzelansatz C des Finanzierungsplans) Siehe Arbeitspaket 1

## 2.2.1 Erzielte Ergebnisse

### 2.2.1.1 Untersuchung des Zerfallsverhaltens spezifischer Gibberelline

Es ist bekannt, dass GAs in wässrigen Lösungen spontan zerfallen<sup>15</sup>. Eine Kenntnis der Zerfallsgeschwindigkeiten ist notwendig für die Auslegung des Fermentations- und Aufreinigungsprozesses. Daher wurde der Zerfall der GAs bei unterschiedlichen pH-Werten und Temperaturen bestimmt. Die Zerfallskonstanten unter Fermentationsbedingungen sind in Abb. 11 dargestellt. Generell steigt die Zerfallskonstante von GA<sub>4</sub> über GA<sub>3</sub> zu GA<sub>7</sub> an. Demnach ist GA<sub>4</sub> das stabilste Gibberellin und GA<sub>7</sub> zerfällt am schnellsten.

Da die Zerfallsprozesse auch während der Fermentation auftreten, bestimmt der Zerfall auch die maximale GA-Konzentration. Je kleiner die Zerfallskonstante, desto höher ist die maximale Produktausbeute. Der geringste Zerfall der GAs wird im pH-Bereich zwischen 4 und 6 beobachtet. Dies entspricht auch dem Optimalbereich für die Fermentation (Siehe Arbeitspaket 3).

Der Zerfall der GAs nimmt mit steigender Temperatur zu. So führte eine Temperaturerhöhung um 25 °C zu einer 10-15 fachen Beschleunigung des Zerfalls. Daher sollte bei der Aufreinigung die Temperatur möglichst niedrig gehalten werden.

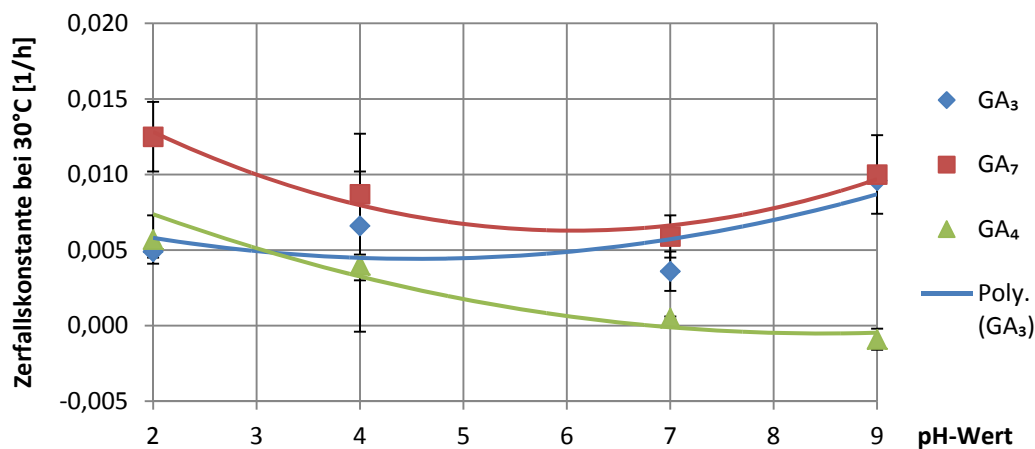


Abb. 11: Zerfall der Gibberelline GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> und GA<sub>7</sub> bei unterschiedlichen pH-Werten.

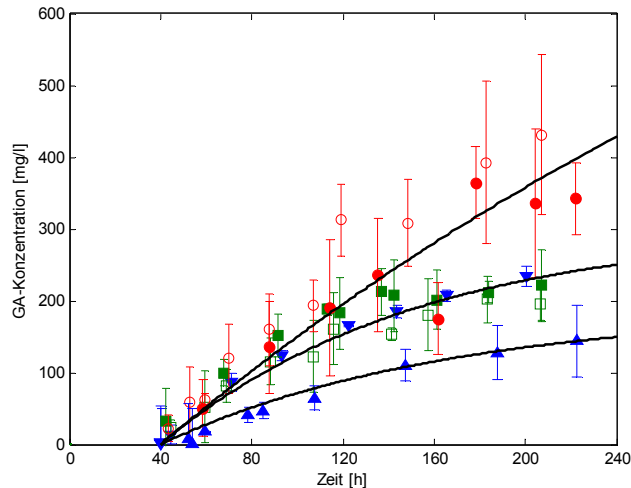
### 2.2.1.2 Übertragung der Fermentationsbedingungen in Abhängigkeit des Produktionsstammes bzw. des Ziel-Gibberellins

Die von Fo-St. 1 gelieferten GA<sub>3</sub>-Produzenten IMI58289 und m567, die GA<sub>7</sub>-Produzenten 6314 und 6314/ $\Delta$ ppt1 sowie die GA<sub>4</sub>-Produzenten 6314/ $\Delta$ des und 6314/ $\Delta$ des/ $\Delta$ ppt1 wurden unter gleichen Bedingungen kultiviert und direkt miteinander verglichen.

Die Gibberellinausbeute hing von der Art des produzierten Gibberellins ab (Abb. 11). Die GA<sub>4</sub>-Produzenten zeigten die höchste Produktausbeute gefolgt von den GA<sub>7</sub>-Produzenten und dem Stamm m567. Es stellte sich heraus, dass dieses Ergebnis auf die unterschiedlichen Zerfallsgeschwindigkeiten zurückzuführen war und alle Stämme mit Ausnahme von IMI58289 eine gleiche Produktivität pro Biomasse zeigten. Daher kann angenommen werden, dass alle Fermentationsbedingungen, die keinen Einfluss auf den GA-Zerfall haben, direkt auf andere Produktionsstämme übertragbar sind. Der Stamm IMI58289 wurde als Produktionsstamm verworfen.

Das Enzym Phosphopantetheinyl-Transferase wird durch das Gen *ppt1* codiert und ist essentiell für viele Reaktionen im Metabolismus von *Fusarium fujikuroi*. Dazu gehören die Stoffwechselwege vieler Nebenprodukte der GA-Fermentation, besonders die der Carotinoide und des Bikaverin. Eine Ausschaltung von *ppt1* bewirkte eine Vermeidung dieser Nebenprodukte und damit eine Erleichterung der GA-Aufreinigung. Stämme ohne das Gen *ppt1* zeigten keine veränderte Produktivität (Abb. 12). Allerdings sanken die Einlagerung von Speicherstoffen und die Glukoseaufnahme verglichen mit *ppt1*-exprimierenden Stämmen um ca. 25 %. Daher wurde weniger Glukose für die gleiche Menge an gebildetem GA verbraucht und die Kohlenstoffausbeute stieg ebenfalls um rund 25 %, wodurch die Kosten der Fermentation gesenkt werden können.

<sup>15</sup> F. J Pérez u. a., „Gibberellic acid decomposition and its loss of biological activity in aqueous solutions“, *Phytochemistry* 41, Nr. 3 (1996): 675–679.



**Abb. 11:** Gibberellinkonzentration im Fermenter in Abhängigkeit von der Fermentationszeit der GA<sub>3</sub>-Produzenten IMI58289 ▲, m567 ▼, der GA<sub>7</sub>-Produzenten 6314 ■, 6314/Δppt1 □ sowie der GA<sub>4</sub>-Produzenten 6314/Δdes ● and 6314/Δdes/Δppt1 ○.

## 2.3 Teilziel/Arbeitspaket 3

- **Verwendung der Zuwendung**
- Durchgeführte Arbeiten:  
 Variationen und Optimierungen der Prozessparameter.  
 Untersuchungen zur kontinuierlichen Kultur mit und ohne Abtrennung der Biomasse.  
 Reindarstellung der Gibberelline.
  
- Dazu benötigt und eingesetzt:
  - wissenschaftlich-technisches Personal  
 (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)  
**Herr Tino Elter** (01.07.2009 bis 30.09.2012, ½ Stelle HPA A)  
**Herr Dipl.-Ing FH Christian Bringmann** (01.01.-28.02.10 HiWi, 01.05.10 – 31.03.12 2/3 Stelle HPA B)  
**Frau Lydia Wächter** (01.03.11 bis 31.10.11 HiWi)  
**Herr Bert Axel Dannemann** (15.11.2011 bis 30.04.2012 HiWi)  
**Herr Christian Kendler** (01.05.2012 bis 30.09.2012 HiWi)
  - Leistungen Dritter:  
 (Einzelansatz C des Finanzierungsplans) Siehe Arbeitspaket 1

### 2.3.1 Erzielte Ergebnisse

#### 2.3.1.1 Variationen und Optimierungen der Prozessparameter

Da bei der Stammcharakterisierung keine Unterschiede zwischen den Stämmen festgestellt werden konnten, wurden die Fermentationsbedingungen anhand des GA<sub>7</sub>-Produzenten 6314/Δppt1 stellvertretend für alle Stämme untersucht.

Der wichtigste Einflussfaktor auf die GA-Bildung ist die Konzentration der Biomasse, die man durch die initiale Konzentration an Stickstoff im Reaktor einstellen kann. So werden pro Millimol eingesetztem Ammonium rund 0.2 g Biomasse gebildet. Pro Gramm Biomasse produzieren die Stämme pro Stunde rund 0.4 mg Gibberellin. Die Biomassekonzentration lässt sich allerdings nicht unendlich erhöhen, da mit ihr auch die Viskosität und der Sauerstoffverbrauch der Kultur steigen. Die höchste noch hantierbare Biomassekonzentration, bei 100 mM initialem Stickstoff, betrug 23 g/l und die maximale Produktivität lag bei rund 7 mg GA pro Liter und Stunde.

Aus der Vielzahl der in der Literatur genannten Prozessparameter mit vermeintlichem Einfluss auf die Gibberellinbildung wurden der Gelöstsauerstoff, die Glukosekonzentration und der pH-Wert in einem vollfaktoriellen Screeningversuch, bestehend aus 16 Einzelexperimenten, im Multifermentersystem variiert. Von den drei Parametern stellte sich nur der pH-Wert als signifikant für die gebildete Gibberellinmenge heraus. Im Anschluss wurde der pH-Wert im Bereich von 2.5 bis 7 in 0.5 pH-Einheiten variiert, um dessen Optimum für die GA-Bildung zu bestimmen. Nach zehn Tagen der Kultivierung lag das Maximum der GA<sub>7</sub>-Konzentration mit 200 mg/l bei pH 4 und sank bei einer Abweichung von 1.5 pH-Einheiten um die Hälfte ab. Dieser Effekt lässt sich auf den spontanen Zerfall von GA<sub>7</sub> zurückführen, welches zwischen pH 4 und 6 seine höchste Stabilität aufweist.

### **2.3.1.2 Untersuchungen zur kontinuierlichen Kultur mit und ohne Abtrennung der Biomasse**

Eine kontinuierliche Fahrweise wird häufig für die Produktion von Bulk-Chemikalien angestrebt, da dabei Rüstzeiten und die exponentielle Phase der Anzucht wegfallen und somit die Raum-Zeit-Ausbeute verbessert werden kann. Darüber hinaus kann bei der Produktion von Sekundärmetaboliten oft ein Produktionsoptimum bei einer bestimmten niedrigen Wachstumsrate beobachtet werden.

Dieser Sachverhalt wurde anhand von quasistationären Fedbatch-Versuchen untersucht. Es stellte sich heraus, dass eine Wachstumslimitation durch Glukose eine starke Verminderung der Gibberellinausbeute zur Folge hatte. Hingegen hing die Produktbildung unter Stickstoff-Limitation von der eingestellten Wachstumsrate ab. Die höchste Produktbildung wurde unter völliger N-Limitation, bei der kein Wachstum mehr stattfindet, beobachtet. Je höher die Wachstumsrate, desto geringer ist die Produktbildung. Demnach sind kontinuierliche Fermentationen zwar möglich, aber nur bei Wachstumsraten nahe Null sinnvoll.

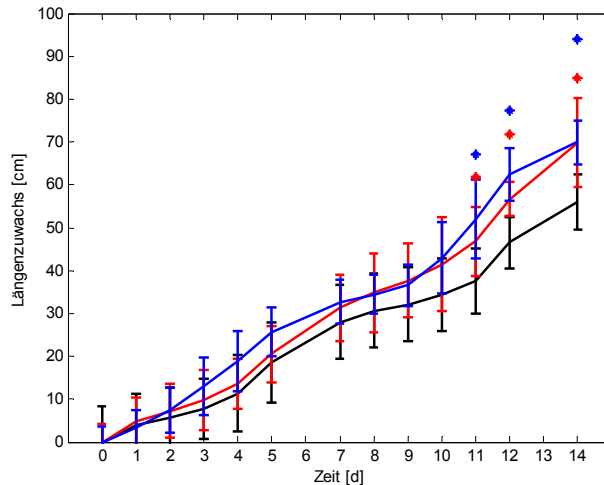
Eine Erweiterung zur kontinuierlichen Kultivierung stellt das Retentostat-Verfahren dar. Dieses eignete sich Tino Elter während seines Aufenthaltes in der Arbeitsgruppe von Prof. Arthur Ram an der Universität Leiden, Niederlande, in der Zeit vom 01.09.2010 - 31.10.2010 an. Damit ist es möglich, die Biomasse im Reaktor zurückzuhalten, zellfreies Medium aus dem Reaktor abzuziehen und dieses durch frisches Medium zu ersetzen. Wie bei der klassischen kontinuierlichen Kultivierung verringern sich die Rüstzeit und die Anwachs-Phase. Zusätzlich werden aber Substratkosten gespart, da dem System keine Biomasse entzogen wird und diese folglich nicht wieder aufgebaut werden muss.

### **2.3.1.3 Reindarstellung der Gibberelline**

Bei der Reindarstellung der GAs kam es zu unerwarteten Schwierigkeiten. Nach der Extraktion der GAs aus dem Fermentationsfiltrat betrug die Reinheit je nach Methode zwischen 16 % für die Flüssig-Flüssig-Extraktion und 30 % für die Adsorption an polymeren Adsorbentien. Dies hatte zur Folge, dass eine Kristallisation der GAs nicht gelang und kein festes Produkt erzeugt werden konnte. Dieses Problem ließ sich erst durch einen zusätzlichen Adsorptionsschritt an Silicagel lösen. Die Probleme mit der Aufreinigung zogen sich bis ins dritte Jahr des Projekts, wodurch bis dahin kein Gibberellin an Fo-St. 3 geliefert werden konnte.

Die Ausschaltung der Nebenprodukte, durch Knock-out des Gens *ppt1*, hatte einen positiven Effekt auf die Aufreinigung. So stieg die Reinheit nach der Polymer-Adsorption auf bis zu 60 % an und das Extrakt lag nach der Verdampfung des Lösemittels als amorphes Pulver vor. Dieses Pulver wurde an Fo-St. 3 übergeben und auf dessen Wirksamkeit hin überprüft. Bei Maispflanzen hatte das Extrakt die gleiche Wirkung wie reines GA der gleichen Konzentration (Abb. 13).





**Abb. 12:** Längenzuwachs von Mais, unbehandelt (schwarz), behandelt mit Extrakt aus der Fermentationsbrühe (rot) und behandelt mit GA-Standard (blau). Sterne markieren signifikante Unterschiede zur Kontrolle.

## 2.4 Teilziel/Arbeitspaket 4

- **Verwendung der Zuwendung**
- Durchgeführte Arbeiten:  
Optimierung des gesamten Herstellungsprozesses.  
Auslegungsrechnungen für die technische Herstellung und eine Produktionskostenabschätzung.
- Dazu benötigt und eingesetzt:
  - wissenschaftlich-technisches Personal  
(Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)  
**Herr Tino Elter** (01.07.2009 bis 30.09.2012, ½ Stelle HPA A)  
**Herr Christian Kendler** (01.05.2012 bis 31.10.2012 HiWi)
  - Leistungen Dritter  
(Einzelansatz C des Finanzierungsplans) Siehe Arbeitspaket 1

### 2.4.1. Erzielte Ergebnisse

#### 2.4.1.1. Optimierung des gesamten Herstellungsprozesses

Da sich, wie in AP 1 beschrieben, die Feststofffermentation nur zur Produktion von GA<sub>4</sub> eignet, ist die Kultur im Flüssig-Medium vorzuziehen. Generell, sollte die Biomassekonzentration so hoch wie möglich gehalten werden, um größtmögliche Produktionsraten zu gewährleisten. Limitierende Größe hierbei ist der Sauerstoffeintrag, der wiederum abhängig von der Reaktorgeometrie, der Begasung und der eingesetzten Rührer ist. Abschließend stellte sich der spontane Zerfall der GAs als der wichtigste Einflussfaktor für die fermentative Produktion heraus. GA<sub>7</sub> hat eine Halbwertszeit von 90 h, während GA<sub>4</sub> mit einer Halbwertszeit von 690 h wesentlich stabiler ist. Die Zerfallskinetik von GA<sub>1</sub> wurde zwar aus Materialmangel nicht bestimmt, sollte aber aufgrund der chemischen Struktur von GA<sub>1</sub> ähnlich der von GA<sub>4</sub> sein. Gemäß den Unterschieden im Zerfall unterscheiden sich die Fermentationsverfahren für das jeweilige Zielprodukt.

GA<sub>4</sub> und GA<sub>1</sub>-Produzenten können durch niedrige Zerfallsgeschwindigkeiten recht lange (>400 h) kultiviert werden. Dadurch werden höhere Produktkonzentrationen erreicht, die wiederum die Aufreinigung erleichtern, da damit das Verhältnis zwischen Gibberellin und Nebenprodukten günstiger wird. Günstige Bedingungen für die Fermentation sind pH 4, 28 °C und eine initiale Stickstoffkonzentration von 100 mM.

GA<sub>7</sub> zerfällt leichter als die übrigen GAs und sollte daher in kurzen Repeated-Batch-Fermentationen (<100 h) bzw. durch Abtrennung des Filtrats und Rückführung der Biomasse

fermentiert werden. Dadurch soll vermieden werden, dass sich GA<sub>7</sub> im Reaktor akkumuliert, was den Zerfall beschleunigen würde. Denkbar wären auch Maßnahmen, die das GA direkt aus dem Fermentationsmedium entfernen. Dies wäre beispielsweise durch Kombination des untersuchten Retentostatverfahrens mit der Adsorption an polymeren Adsorbentien möglich.

#### **2.4.1.2. Auslegungsrechnungen für die technische Herstellung und eine Produktionskostenabschätzung**

Eine genaue Kostenabschätzung des Prozesses ist beim derzeitigen Stand noch nicht möglich. Da die Kosten der Aufreinigung sehr stark von dem Erfolg des Fermentationsverfahrens abhängen, lassen sich diese am wenigsten abschätzen. Im Jahresbericht Haushaltsjahr 2010 wurde eine Kosten-Nutzen Rechnung für die Fermentation anhand aktueller Substratpreise und des Verkaufserlöses für Gibberellinpräparate präsentiert. Für die Produktion von GA<sub>7</sub> mit dem Stamm 6314/Δppt1 im Batch Reaktor unter optimalen Bedingungen ist der Produkterlös etwa 40-mal größer als die Substratkosten. Es ist zu beachten, dass für diese Rechnung der Endverbraucherpreis für das GA<sub>4</sub>/GA<sub>7</sub>-Präparat Regulex® 10SG der Firma Proagro GmbH angenommen wird und dass weder Energie-, Personal- noch Aufreinigungskosten in diese Zahl einfließen. Daher ist davon auszugehen, dass der aktuelle Produktionsprozess nicht wirtschaftlich ist.

Das größte Potential für die Erhöhung der Wirtschaftlichkeit bietet die Stammoptimierung. Während der hier verwendete Stamm bestenfalls 1.7 mg pro Liter Reaktorvolumen und Stunde produzierte (Rüstzeiten inbegriffen) und eine maximale GA-Konzentration von 800 mg/l erreichte, zeigen Stämme anderer Publikationen eine bis zu zehnfache Produktivität und vierfache Produktkonzentrationen<sup>161718</sup>. Mit einem besseren Stamm würde sich die Fermentationsdauer verringern und höhere Produktausbeuten erreicht werden. Kürzere Fermentationen senken die Energie- und Personalkosten, während höhere Produktausbeuten wahrscheinlich die Aufreinigung erleichtern und dort Kosten einsparen.

---

<sup>16</sup> E M Escamilla u. a., „Optimization of gibberellic acid production by immobilized *Gibberella fujikuroi* mycelium in fluidized bioreactors“, *Journal of Biotechnology* 76, Nr. 2–3 (Januar 21, 2000): 147–155.

<sup>17</sup> Geetanjali Lale und Ramchandra Gadre, „Enhanced production of gibberellin A4 (GA4) by a mutant of *Gibberella fujikuroi* in wheat gluten medium“, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 37, Nr. 3 (März 1, 2010): 297–306.

<sup>18</sup> Bettina Tudzynski, „Faktoren der Überproduktion von Sekundärmetaboliten am Beispiel der Gibberellinbildung durch *Gibberella fujikuroi*“ (Habilitation, Fr.-Schiller-Universität Jena, 1991).

### III Forschungsstelle 3

#### 1. Verwendung der Zuwendung und Ergebnisse im Berichtszeitraum

##### 1.1 Teilziel/Arbeitspaket 1

- **Verwendung der Zuwendung**
- Durchgeführte Arbeiten:
  - Erarbeitung einer geeigneten Applikationsrezeptur
  - Untersuchungen zur optimalen Gibberellinkonzentration
- Dazu benötigt und eingesetzt:
  - wissenschaftlich-technisches Personal  
(Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)  
**Frau D. Koltermann** (01.07.2009 bis 30.09.2012, ½ Stelle HPA A)  
**Frau A. Feige** (01.07.2009 bis 30.05.2012, 1 Stelle HPA A)

##### 2.1 Erzielte Ergebnisse

###### 2.1.1 Erarbeitung einer geeigneten Applikationsrezeptur

Die Arbeiten wurden mit den Kulturarten Mais (*Zea mays* L.), Sonnenblume (*Helianthus annuus* L.), Raps (*Brassica napus oleifera* L.), Weizen (*Triticum aestivum* L.) und Gerste (*Hordeum vulgare* L.) in Gefäßversuchen (Gewächshaus bzw. im Freiland) sowie mit Chinaschilf (*Miscanthus sacchariflorus* (MAXIM.) HACK.) in Feldversuchen realisiert.

Nach intensiver Beratung mit Herrn Dr. Rademacher (vormals BASF, Mitglied des projektbegleitenden Ausschusses) wurden Blattapplikationsrezepturen unter Beimischung unterschiedlicher Konzentrationen von Ammoniumsulfat und Zitronensäure sowie einer Reihe von Tensiden geprüft und bewertet. Alle eingesetzten GAs wurden zunächst als 0,1 m Stammlösungen in einem Ethanol-Aceton-Gemisch (1:1) unter Berücksichtigung der Reinheit angesetzt und aus diesen definierte Mengen für die jeweiligen Versuche entnommen. Als vielversprechende Formulierung hat sich eine Zusammensetzung einer Blattdüngelösung mit 1 g Ammoniumsulfat, 1 g Zitronensäure und 0,05 % eines beliebigen Spülmittels in 1 l Wasser herausgestellt.

###### 2.1.2 Untersuchungen zur optimalen Gibberellinkonzentration

Um Informationen zur optimalen Gibberellinkonzentration zu erhalten, wurde für die Blattapplikation von GA<sub>3</sub>, GA<sub>4/7</sub> und GA<sub>1</sub> ein großer Konzentrationsbereich ( $10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  mol/l,  $1,5 \times 10^{-4}$  mol/l,  $2 \times 10^{-4}$  mol/l  $3 \times 10^{-4}$  mol/l) geprüft. Aus diesen Versuchen kann gefolgert werden, dass für die Steigerung des Längenwachstums ohne negative Begleiteffekte (wie z. B. kleinere Sonnenblumenkörbe) und unter Einbeziehung einer ökonomischen Bewertung ein Konzentrationsbereich von  $5 \times 10^{-5}$  bis  $10^{-4}$  mol/l optimal ist. Da der gesteigerte Längenzuwachs bei den Getreidearten Weizen und Gerste jedoch auch zu einer erhöhten Lagerneigung führte, können Gibberelline bei diesen Arten generell nur zu einem späteren Entwicklungsstadium sinnvoll eingesetzt werden. Dies wurde bei der Planung der Feldversuche berücksichtigt.

##### 2.2. Teilziel/Arbeitspaket 2

- **Verwendung der Zuwendung**
- Durchgeführte Arbeiten:
  - Testen der Gibberelline bei ausgewählten potentiellen Energiepflanzen
- Dazu benötigt und eingesetzt:
  - wissenschaftlich-technisches Personal  
(Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)  
**Frau D. Koltermann** (01.07.2009 bis 30.09.2012, ½ Stelle HPA A)  
**Frau A. Feige** (01.07.2009 bis 30.05.2012, 1 Stelle HPA A)
  - Geräte:  
(Einzelansatz B des Finanzierungsplans)

Für die Abschätzung der Produktqualität wurde das vom Projekt finanzierte Spektrometer eingesetzt.

## 2.2.1 Erzielte Ergebnisse

### 2.2.1.1 Testen der Gibberelline bei ausgewählten potentiellen Energiepflanzen

An ausgewählten potentiellen Energiepflanzen sollte geprüft werden, ob mit Hilfe von Gibberellinen eine Steigerung der Biomasse (bei Mais und Chinaschilf), der energierelevanten Inhaltsstoffe (bei Raps, Weizen und Sonnenblume) oder eine Blüh-/Abreifeverfrüherung (bei Sonnenblume) und folglich eine Ertragssteigerung oder zumindest -stabilisierung erzielt werden kann. Dabei war vor allem die Gegenüberstellung der isolierten

Winterraps (WR)				Winterweizen (WW)				Mais (M)		Sonnenblumen (Sbl)			
K2	GA3			K2	K1	GA4	K1	K2	K1	K2	K1	GA4	K1
GA4/7	GA4	GA7	GA4	K2	GA7	GA7	K2	GA4	K1	K2	GA7	GA7	K2
Applikationstermin 2				Applikationstermin 2						Applikationstermin 2			
GA4	K1	K2	K2	GA4	GA7	K2	GA7	K2	GA7	GA4	GA7	K2	GA7
GA4	GA7	GA3	GA4/7	K1	GA4	K1	GA4	GA7	K2	K1	GA4	K1	GA4
K2	K1	GA4	K1	K2	K1	GA4	K1	GA4	K1	K2	K1	GA4	K1
GA4/7	GA7	GA4/7	GA3	K2	GA7	GA7	K2	K2	GA7	K2	GA7	GA7	K2
Applikationstermin 1				Applikationstermin 1						Applikationstermin 1			
K1	K1	K2	GA7	GA4	GA7	K2	GA7	K1	GA4	GA4	GA7	K2	GA7
GA3	GA7	GA4/7	GA3	K1	GA4	K1	GA4	GA7	GA4	K1	GA4	K1	GA4

**Abb. 14: Feldversuchsplan 2010.** (I und II: 1. und 2. Applikationstermin; a-e: Wiederholungen; K1: unbehandelte Kontrolle, K2: Kontrolle mit Spritzlösung ohne Gibberellin; Parzellengröße: 6 × 9 m (WR: Winterraps, WW: Winterweizen, M: Mais); 5 × 9 m (Sbl: Sonnenblume).

GAs mit unterschiedlicher Wirkdauer (GA<sub>4</sub> und GA<sub>7</sub>) von Interesse. Während GA<sub>4</sub> aufgrund schnelleren Abbaus als kurzzeitig wirkend gilt, wird GA<sub>7</sub> als stabiler und langfristig wirkend beschrieben<sup>19</sup>. Ausschließlich bei Raps wurden auch die kommerziellen GAs (GA<sub>3</sub>, GA<sub>4/7</sub>) vergleichsweise mit geprüft. Generell wurden die GAs in einer Konzentration von 5 × 10<sup>-5</sup> mol/l als Blattapplikation mit herkömmlicher Spritztechnik ausgebracht.

Die Feldversuche wurden am Standort Braunschweig für zwei Jahre (2010, 2011) in Form einer randomisierten Blockanlage mit den vier Kulturarten Winterraps, Winterweizen, Mais und Sonnenblume angelegt (Abb. 15). Bei Mais erfolgte die Applikation zum Entwicklungsstadium BBCH 16, bei Winterraps kurz vor der Blüte (BBCH 59), bei Winterweizen nach der Bestockung (BBCH 29-30) sowie kurz vor der Blüte (BBCH 59) und bei der Sonnenblume zum Sternstadium (BBCH 33/51) bzw. zum Blühbeginn (BBCH 59-61). Im Jahr 2011 gab es zwei Änderungen: Einerseits wurde aufgrund von Auswinterung Sommerraps statt Winterraps eingesetzt und andererseits der frühe Applikationstermin um eine Woche vorverlegt (eine Woche vor Sternstadium; BBCH 32-33).

Zusätzlich wurde an einem zweijährigen Chinaschilfbestand in den gleichen Versuchs-jahren (2010/11; 2011/12) eine Mehrfachapplikation mit GA<sub>4</sub> und GA<sub>7</sub> durchgeführt. Dazu wurden 6 m<sup>2</sup> große, vollständig randomisierten Parzellen mit jeweils 9 Pflanzen verwendet.

<sup>19</sup> Sponsel V. (2010) Topic 20.1: Structures of Some Important Gibberellins and Their Precursors, Derivatives, and Inhibitors of Gibberellin Biosynthesis In: Taiz, L., Zeiger, E. (Hrsg.), Plant Physiology, Fifth Edition Online. <<http://www.plantphys.net>> Accessed [12.03.2012]

Die Ergebnisse sind wegen der besseren Vergleichbarkeit als zweijährige Versuchsergebnisse ausgewertet und unter Arbeitspaket 4 zusammengestellt worden.

## 2.2. Teilziel/Arbeitspaket 3

- **Verwendung der Zuwendung**
  
- Durchgeführte Arbeiten:  
Untersuchungen zur Ausbringungstechnik (Boden- vs. Blattapplikation)  
Untersuchungen unterschiedlicher Rezepturen
  
- Dazu benötigt und eingesetzt:
  - wissenschaftlich-technisches Personal:  
(Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)  
**Frau D. Koltermann** (01.07.2009 bis 30.09.2012, ½ Stelle HPA A)  
**Frau A. Feige** (01.07.2009 bis 30.05.2012, 1 Stelle HPA A)

### 2.2.1. Erzielte Ergebnisse

#### 2.2.1.1. Untersuchungen zur Ausbringungstechnik (Blatt- vs. Bodenapplikation)

Es wurden eine Blattapplikation und zwei Bodenapplikationsvarianten unter Nutzung der kommerziell verfügbaren GAs  $GA_3$  und  $GA_{4/7}$  miteinander verglichen. Bei der Blattapplikation sowie der Bodeninjektion wurde eine Gibberellinkonzentration von 50 ppm gewählt, während bei der Wurzelapplikation in Form einer Gießlösung eine Konzentration von  $10^{-4}$  mol/l (ca. 35 ppm) eingesetzt wurde. Für den Vergleich von Blattapplikation und Bodeninjektion wurden Mais (Sorte PR39G12) zum BBCH 16 und Sonnenblume (Sorte Metharoc) zum BBCH 18/32 herangezogen, im Falle der Wurzelapplikation per Gießlösung die Sonnenblume (Sorte Metharoc) zum BBCH 12 genutzt.

##### 2.2.1.1.1 Blattapplikation

Für die Blattapplikation wurde die erarbeitete Formulierung der Blattdüngelösung verwendet. Dazu wurden mit Hilfe einer Drucksprühflasche (Firma Gloria, 1,25 l) alle Blätter der Versuchspflanzen vollständig benetzt, wobei etwa 50 ml pro Pflanze verbraucht wurden.

Bei der Sonnenblume konnte für beide Gibberellinpräparate eine längere Wirksamkeit beobachtet werden als bei Mais, jedoch unterschieden sich  $GA_3$  und  $GA_{4/7}$  innerhalb der jeweiligen Kulturart nicht hinsichtlich der Wirkungsdauer der induzierten Steigerung des Längenwachstums (Mais: 3 - 7 Tage; Sonnenblume: ca. 3 Wochen). Außerdem konnte das Längenwachstum bei Mais lediglich temporär gefördert werden, während bei der Sonnenblume bis zum Versuchsende, zu dem die überwiegende Anzahl der Pflanzen in Vollblüte standen (Tag 44 nach Applikation), ein zusätzlicher Längenzuwachs von 34 cm durch  $GA_{4/7}$  und 16 cm durch  $GA_3$  bewirkt werden konnte. Im Gegensatz zu Mais unterschieden sich  $GA_3$  und  $GA_{4/7}$  bei der Sonnenblume also auch hinsichtlich ihrer Wirkungsintensität. Hinsichtlich des Blühzeitpunktes bei der Sonnenblume wurde durch  $GA_{4/7}$  eine Blühverfrüherung von zwei Wochen und durch  $GA_3$  von einer Woche beobachtet. Die 50 ppm-Applikation von  $GA_{4/7}$  verursachte jedoch auch im Vergleich zur Kontrolle und der  $GA_3$ -Variante verkleinerte Sonnenblumenkörbe.

##### 2.2.1.1.2 Bodenapplikation

Es wurden zwei unterschiedliche Verfahren der Bodenapplikation geprüft. Zum einen wurde einer Flüssiginjektionsdüngelösung (Ammoniumnitrat-Harnstoff-Lösung, Stickstoffgehalt 28 - 30%) 50 ppm  $GA_3$  bzw.  $GA_{4/7}$  zugegeben und nahe der Pflanze in den Boden injiziert. Durch diese Art der Verabreichung von GAs konnte keine Steigerung des Längenwachstums bzw. Blühverfrüherung induziert werden. Mögliche Ursachen dieser fehlenden Wirkung könnte eine Inaktivierung der Gibberelline aufgrund des hohen pH-Werts (6,4 – 7,2) der Düngelösung oder aber eine zu geringe Konzentration der Gibberelline sein, da sich die Pflanze aufgrund des toxisch hohen Ammoniumgehalts nur an der Peripherie der sich im Boden bildenden Düngerblase bedienen kann und somit die Pflanzen pro Zeiteinheit keine ausreichenden GA-Konzentrationen aufnehmen können.

Im zweiten Verfahren wurde den Pflanzen die im Projekt erarbeitete Blattdüngelösung (100 ml) mit  $10^{-4}$  mol/l  $GA_3$  bzw.  $GA_{4/7}$  als Gießlösung über den Boden zugeführt. Dieses Verfahren konnte im Gegensatz zum anderen Bodenapplikationsverfahren einen Längenzuwachs induzieren, der allerdings im Vergleich zur Blattapplikation mit lediglich 10 - 14 cm zu Versuchsende (Tag 44 nach Applikation)

für beiden Gibberelline gleichermaßen deutlich geringer ausfiel. Eine Blühverfrühung wurde nicht induziert.

Es bleibt festzuhalten, dass alle GAs bei beiden Kulturarten aufgrund einer Blattapplikation eine stärkere Wirkung zeigten als bei den beiden Bodenapplikationen. Somit ist aus Sicht der erzielten Längenwachstumssteigerung und Blühverfrühung sowie unter dem Aspekt eines wirtschaftlichen Einsatzes der GAs die Blattapplikation die effizientere Ausbringungstechnik.

#### **2.2.1.2. Untersuchungen unterschiedlicher Rezepturen**

Mit der ausgearbeiteten Blattapplikationsrezeptur wurden vergleichende Tests am Beispiel des isolierten GA<sub>4</sub> (10<sup>-4</sup> mol/l) unter Verwendung anderer Hilfsstoffe in wässriger Lösung (Netz-/Haftmittel: 0,02 % „BreakThru“ (Fa. BASF); 0,06 % „proagro-Netzmittel“ und 0,1 % „ProNet-Alfa“ (beide Fa. proagro GmbH)) an Mais durchgeführt. Die Konzentrationen der Zusatzstoffe wurden in Anlehnung an die Herstellervorgaben gewählt. Zwar zeigten sich zwischen den Varianten deutliche Unterschiede hinsichtlich des Wirkungseintritts („ProNet-Alfa“, „Break-Thru“: zwischen Tag 2 und Tag 3; Blattdüngelösung: zwischen Tag 4 und Tag 5; „Proagro-Netzmittel“: eine Woche), jedoch unterschieden sich die vier Varianten untereinander nicht signifikant in der Wirkungsintensität. Lediglich bei Zusatz der Blattdüngelösung wurde im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante, aber lediglich temporäre Steigerung des Längenzuwachses (11 cm am Tag 10 nach der Applikation) erreicht. In puncto Wirkungsdauer war die Blattdüngelösung den anderen Zusatzstoffen mit einem Tag Unterschied ebenfalls leicht überlegen. Somit lässt sich zusammenfassend festhalten, dass sich für den Fall einer Gibberellinblattapplikation der Einsatz der erarbeiteten, oben spezifizierten Blattdüngelösung als am wirkungsvollsten herausstellte.

### **2.3. Teilziel/Arbeitspaket 4**

- **Verwendung der Zuwendung**

- Durchgeführte Arbeiten:

Auswertung der Testung der Gibberelline an ausgewählten Energiepflanzen.  
Erarbeitung einer Vorschrift für die sachgerechte Ausbringung der Gibberelline.  
Wirtschaftliche Bewertung der Ergebnisse.

- Dazu benötigt und eingesetzt:

- wissenschaftlich-technisches Personal:

(Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)

**Frau D. Koltermann** (01.07.2009 bis 30.09.2012, ½ Stelle HPA A)

**Frau A. Feige** (01.07.2009 bis 30.05.2012, 1 Stelle HPA A)

- Geräte:

(Einzelansatz B des Finanzierungsplans)

Für die Abschätzung der Produktqualität wurde das vom Projekt finanzierte Spektrometer eingesetzt.

#### **2.3.1. Erzielte Ergebnisse**

##### **2.3.1.1. Auswertung der Testung der Gibberelline an ausgewählten Energiepflanzen**

###### **2.3.1.1.1. Gibberellinwirkung auf den Kornertrag und das Tausendkorngewicht**

Winter- bzw. Sommerraps sowie Winterweizen und Sonnenblume wurden durch die Gibberellinbehandlung im Kornertrag nicht beeinflusst. Das Tausendkorngewicht als einer der Ertragsparameter wurde lediglich 2010 bei Winterraps durch die GA<sub>7</sub>-Applikation im Vergleich zum Tausendkorngewicht der Kontrollen (K1, K2), der GA<sub>3</sub>- sowie GA<sub>4</sub>- Variante signifikant gesteigert (Tab. 1). Bis zu diesem Zeitpunkt ist eine solche Wirkung von GA<sub>7</sub> an Winterraps nicht beschrieben worden. Lediglich für GA<sub>3</sub> an Gerste wurde ebenfalls eine signifikante Erhöhung des TKG dokumentiert<sup>20</sup>.

<sup>20</sup> Rukasz, I., Michałek, W. (2004) Effect of foliar application of phytohormones on barley yielding. Annales-Universitatis Mariae Curie-Skłodowska.Lublin-Polonia. Vol. LIX, Nr 4 Sectio E: 1543-1548.

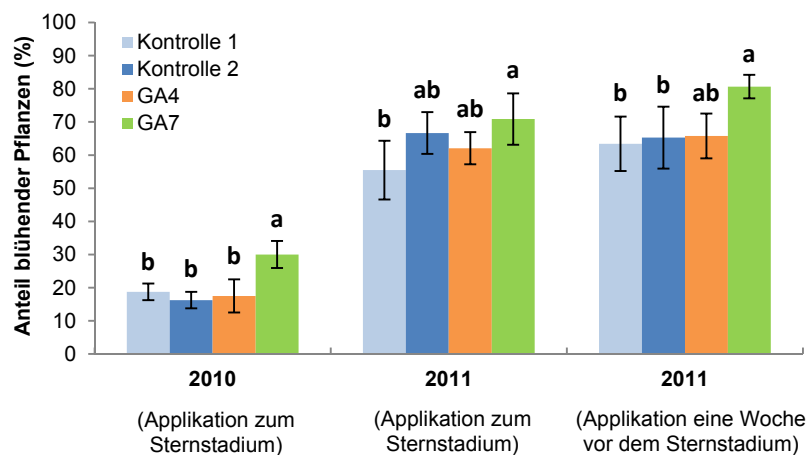
**Tab. 1** Tausendkorngewicht von Winterraps nach Gibberellinapplikation (2010).

Variante	TKG (g)
K1	4.34bc
K2	4.30bc
GA <sub>3</sub>	4.21c
GA <sub>4</sub>	4.26bc
GA <sub>4/7</sub>	4.36ac
GA <sub>7</sub>	4.52a

(Tukey-Test  $p \leq 0,05$ )

### 2.3.1.1.2. Gibberellinwirkung auf den Blühzeitpunkt und die Abreifedauer

In beiden Jahren (2010, 2011) konnte bei der Sonnenblume durch frühe Applikation von GA<sub>7</sub> eine signifikant schnellere Blütenentwicklung bewirkt werden, sowohl 2010 bei Applikation zum Sternstadium als auch 2011 bei Applikation eine Woche vor dem Sternstadium (Abb. 15). Das Reifestadium der Pflanzen wurde anhand einer Boniturskala von 9 (Pflanze komplett grün) bis 1 (Pflanzen komplettbraun, abgestorben) klassifiziert. Während diese Blühverfrüherung 2010 auch von einer signifikant schnelleren Abreife (GA<sub>7</sub>-Pflanzen mit Reifestadium 3; Kontrollpflanzen mit Reifestadium 4) begleitet wurde, wurde dieser Effekt im Jahr 2011 nicht festgestellt. Bislang sind Informationen über Gibberellinbehandlung von Sonnenblumen äußerst selten. Lediglich für GA<sub>3</sub> ist in einer früheren Studie eine Verfrüherung der Blütenbildung dokumentiert worden<sup>21</sup>.



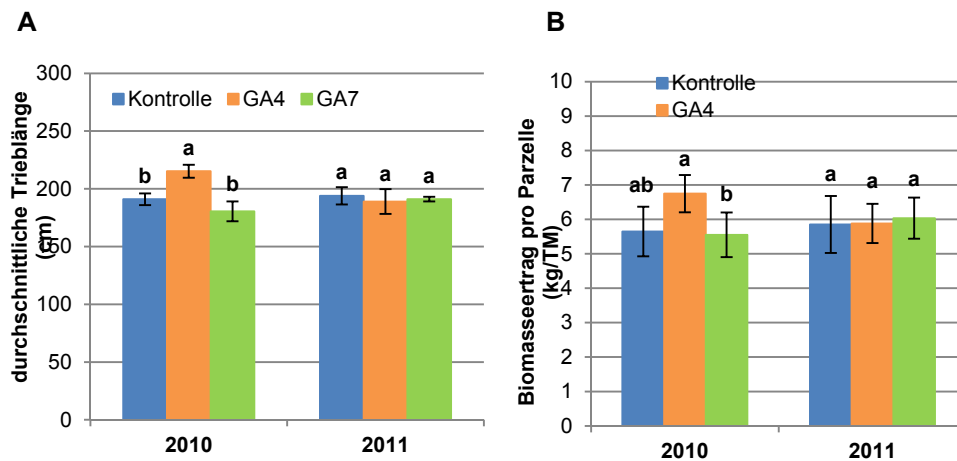
**Abb. 15:** Anteil blühender Sonnenblumenpflanzen im August nach Applikation von GA<sub>4</sub> bzw. GA<sub>7</sub> (2010, 2011); (Tukey-Test  $p \leq 0,05$ , für das jeweilige Jahr).

### 2.3.1.1.3. Gibberellinwirkung auf den Biomasseertrag

In den zweijährigen Feldversuchen wurden bei Mais keine erhöhten Biomasseerträge durch einmalige Applikation von GA<sub>4</sub> bzw. GA<sub>7</sub> hervorgerufen. Eine dreimalige Gibberellinapplikation im Jahr 2010 führte bei Chinaschilf in Abhängigkeit von der Gibberellinart zu dauerhaft verlängerten Trieben und gesteigerten Biomasseerträgen. In einer Studie mit *Lolium temulentum* L.<sup>22</sup>, eine wie *M. sacchariflorus* ebenfalls den Süßgräser (Poaceae) zugehörige Pflanze, wurde eine gleichstarke Förderung des Längenwachstums der Internodien durch GA<sub>4</sub> und GA<sub>7</sub> beschrieben. Berücksichtigt man den Zeitraum (von drei Wochen) dieser Versuche, entsprechen die geschilderten Beobachtungen auch den unsrigen für die ersten vier Wochen (12.05 – 09.06.10). Allerdings zeigte bei der Abschlussbonitur des Chinaschilfs zur Ernte im März 2011 lediglich die dreimalige Applikation von GA<sub>4</sub> dauerhaft gesteigerte Triebhöhen (Abb. 16A) und einen damit korrelierten höheren Biomasseertrag im Vergleich zu den GA<sub>7</sub> applizierten Pflanzen (Abb. 16B) auf. Im Vergleich zur Kontrolle wiesen die GA<sub>4</sub> applizierten Pflanzen jedoch nur einen tendenziell höheren Biomasseertrag auf (Abb. 16B). Dieses Ergebnis konnte allerdings im zweiten Versuchsjahr (2011), möglicherweise aufgrund abweichender Wetterbedingungen, bei vierfacher Gibberellinapplikation nicht verifiziert werden.

<sup>21</sup> Almeida J.A.S., Pereira M.F.D.A. (1996) The control of flower initiation by gibberellin in *Helianthus annuus* L (sunflower), a non-photoperiodic plant. *Plant Growth Regulation* 19:109-115.

<sup>22</sup> Evans L.T., King R.W., Chu A., Mander L.N., Pharis R.P. (1990). Gibberellin structure and florigenic activity in *Lolium temulentum*, a long day plant. *Planta* 182:97-106.



**Abb. 16:** **A:** Durchschnittliche Triebblänge von Chinaschilf zur Ernte nach dreimaliger (2010) bzw. viermaliger (2011) Applikation von GA<sub>4</sub> bzw. GA<sub>7</sub> (Tukey-Test  $p \leq 0,05$ , für das jeweilige Jahr) **B:** Biomasseertrag von Chinaschilf pro Parzelle (6 m<sup>2</sup>) nach dreimaliger (2010) bzw. viermaliger (2011) Applikation von GA<sub>4</sub> bzw. GA<sub>7</sub> (Tukey-Test  $p \leq 0,05$ , für das jeweilige Jahr)

#### 2.3.1.1.4. Gibberellinwirkung auf die energierelevanten Inhaltsstoffgehalte

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich zeigte sich bei der Sonnenblume im ersten Jahr (2010) nach GA<sub>4</sub>-Applikation zum Blühbeginn eine signifikante Verringerung des Gesamtfett- sowie des Rohproteingehaltes, während durch GA<sub>7</sub>-Applikation zum Sternstadium eine signifikante Erhöhung des Gesamtfettgehalts induziert wurde. Diese Erhöhung ist vermutlich auf die allgemeine Beschleunigung der Abreife zurückzuführen und hatte keinen Einfluss auf den Gesamtölertrag. Generell war der Gesamtfettgehalt erhöht, wenn die Gibberellinapplikation spät (zum Blühbeginn) erfolgte.

Im zweiten Jahr (2011) rief die frühere GA<sub>7</sub>-Applikation (eine Woche vor dem Sternstadium) eine signifikante Erhöhung des Rohproteingehalts hervor.

**Tab. 2** Gesamtfett- und Rohproteingehalt von Sonnenblumenkernen nach Gibberellinapplikation (2010/2011).

Versuchs-variante	2010			2011		
	Applikation zum Sternstadium	Applikation zum Blühbeginn	MW	Applikation eine Woche vor dem Sternstadium	Applikation zum Sternstadium	MW
<b>Gesamtfettgehalt (%)</b>						
K1	49.15 bc	50.64 a	49.90 B	50.76 ab	51.29 a	51.02 A
K2	49.07 c	51.21 a	50.14 B	51.26 ab	50.91 ab	51.09 A
GA4	49.92 ab	49.55 b	49.73 B	51.78 a	51.31 a	51.55 A
GA7	50.20 a	51.49 a	50.84 A	50.15 b	49.89 b	50.02 B
MW	49.58 B	50.72 A	WW <.0001	50.99 A	50.85 A	WW n.s.
<b>Rohproteingehalt (%)</b>						
K1	14.32 a	14.81 ab	14.56 AB	13.96 b	14.16 ab	14.06 B
K2	15.08 a	14.87 a	14.98 A	13.86 b	14.13 ab	14.00 B
GA4	14.31 a	14.08 c	14.19 B	14.02 b	13.72 b	13.87 B
GA7	14.44 a	14.12 bc	14.28 B	14.48 a	14.58 a	14.53 A
MW	14.54 A	14.47 A	WW n. s.	14.08 A	14.15 A	WW n. s.

(Tukey-Test  $p \leq 0,05$ , für das jeweilige Jahr)

Im Jahr 2010 traten keine Veränderungen in den Gehalten der Hauptfettsäuren (Linol-, Öl-, Palmitin- und Stearinsäure) in den geernteten Sonnenblumenkernen aufgrund der gewählten Gibberellinanwendungen auf. Dagegen waren im Jahr 2011 durch die Applikation von GA<sub>7</sub> die Gehalte an Linol- und Palmitinsäure signifikant verringert und die Öl- und Stearinsäuregehalte signifikant erhöht (Tab. 3). Die Verringerung des Linolsäuregehaltes war bei späterer GA<sub>7</sub>- Applikation (zum

<sup>23</sup> Eriksson M.E., Israelsson M., Olsson O., Moritz T. (2000) Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length. Nat Biotechnol 18:784-8.



Sternstadium) etwas stärker ausgeprägt als bei der früheren Applikation (eine Woche vor Sternstadium). Beim Stearinsäuregehalt verhielt es sich genau anders herum.

### 2.3.2. Erarbeitung einer Vorschrift für die sachgerechte Ausbringung der Gibberelline

Die Ausbringung der Gibberelline erfolgt mit der gängigen Spritztechnik, die auch für Pflanzenschutzmittel eingesetzt wird. Als Aufwandmenge sind 500 l/ha einzuplanen, um eine gleichförmige und ausreichende Benetzung der Blätter zu gewährleisten. Die Blattdüngelösung muss stets frisch angesetzt werden. Um zu gewährleisten, dass alle Bestandteile vollständig gelöst vorliegen, ist zunächst eine konzentrierte Blattdüngelösung in einem 10 l Kanister anzusetzen. Das Spülmittel kann bei Bedarf durch gängige Netzmittel, die leichter zu dosieren sind und weniger schäumen, ersetzt werden. Das jeweilige Gibberellin (Pulverform) wird eingewogen und kann aufgrund der eingesetzten großen Wassermenge auch ohne vorheriges Lösen in organischen Lösungsmitteln zugesetzt werden. Der Inhalt des Kanisters muss anschließend vermisch werden. Nach Überführung des Kanisterinhalts in den Tank der Feldspritze wird je nach Größe der zu behandelnden Fläche mit Wasser aufgefüllt. Die Anwendung wird morgens oder abends bei Temperaturen zwischen 5 und 25 °C vorgenommen. Die Gibberellinanwendung sollte möglichst innerhalb von 4 Stunden nach Ansetzen der Spritzlösung erfolgen.

**Tab. 3** Gehalte an Linol-, Öl-, Palmitin- und Stearinsäure in Sonnenblumenkernen nach Gibberellinapplikation (2011).

Variante	Applikation eine Woche vor Sternstadium	Applikation zum Sternstadium	MW
<b>Linolsäure (%)</b>			
K1	74.76 a	74.86 a	74.81 A
K2	74.96 a	74.99 a	74.98 A
GA4	75.09 a	74.77 a	74.93 A
GA7	74.13 b	73.09 b	73.61 B
MW	74.74 A	74.43 B	WW 0.03
<b>Ölsäure (%)</b>			
K1	14.77 b	14.69 b	14.73 B
K2	14.65 b	14.60 b	14.63 B
GA4	14.53 b	14.77 b	14.65 B
GA7	15.24 a	16.09 a	15.66 A
MW	14.80 A	15.04 A	WW n. s.
<b>Palmitinsäure (%)</b>			
K1	5.75 a	5.73 a	5.74 A
K2	5.76 a	5.78 a	5.77 A
GA4	5.77 a	5.75 a	5.76 A
GA7	5.67 b	5.55 a	5.61 B
MW	5.74 A	5.70 A	WW n. s.
<b>Stearinsäure (%)</b>			
K1	3.52 b	3.57 ab	3.55 B
K2	3.46 b	3.49 b	3.47 B
GA4	3.46 b	3.56 b	3.51 B
GA7	3.74 a	4.01 a	3.87 A
MW	3.55 B	3.66 A	WW n. s.

(Tukey-Test  $p \leq 0,05$ )

### 3. Wirtschaftliche Bewertung der Ergebnisse

Im Jahr 2008 nahmen Wachstumsregulatoren neben den Hauptbereichen Herbizide (45%) sowie Fungizide und Insektizide (jeweils 25 %) lediglich einen Anteil von 2,5 % des Weltmarkts für Pflanzenschutz mit einem jährlichen Umsatz von etwa 800 Mio € ein. Der Anteil der Gibberelline daran beträgt lediglich 50 – 100 Mio € und konzentriert sich auf die drei Haupthersteller bzw. -vertreiber Syngenta, BASF und Valent. Diese Gesamtsumme verteilt sich auf (1) GA<sub>3</sub> zum Einsatz in Gartenbau, Landwirtschaft und Forst (ca. 55 Mio €), (2) GA<sub>3</sub> zum Einsatz in der Bierbrauerei (ca. 30 Mio €) und (3) GA<sub>4/7</sub> für den Einsatz im Gartenbau (ca. 8 Mio €).

Die Kosten für ein Kilogramm GA<sub>3</sub> (mind. 90 % Reinheit) belaufen sich auf etwa 174-200 € (Internetangebot der Firma SUNIVO, Shanghai, Stand 11.02.2010), während der Preis für die gleiche Menge GA<sub>4/7</sub> von BASF auf das Fünffache geschätzt wird. Eine Konkurrenzfähigkeit von Gibberellinen nach einem alternativen Herstellungsverfahren oder mit besonderer Reinheit orientiert sich also zunächst an diesen finanziellen Größenordnungen, es sei denn, die isolierten Gibberelline können in neuen hochpreisigen Spezialbereichen oder bei den landwirtschaftlichen Hauptkulturen Anwendung finden.

Die Firma proagro GmbH vermarktet seit einigen Jahren Gibberelline in Sonderkulturen (Apfel, Birne, Wein, Gartenbau) in Deutschland. In diesen von proagro vertriebenen Formulierungen werden für 10 g reines GA<sub>4/7</sub> etwa 80 € und für 10 g reines GA<sub>3</sub> etwa 55 € erzielt (pers. Mitt. der Firma proagro GmbH).

Eine vergleichende ökonomische Betrachtung für die molekularbiologisch optimierten Pilzstämme gestaltet sich prinzipiell schwierig, da für die molokulargenetische Veränderung keine Hochleistungsstämme vorlagen und damit auch keine realistische Einschätzung der möglichen Produktionsleistung beim Upscaling erzielt werden konnte. Auch die Entwicklung des Produktionsverfahrens mit anschließender Aufreinigung der isolierten Gibberelline konnte im Rahmen des Projekts nicht so weit vorangetrieben werden, dass eine ökonomische Vergleichsrechnung mit den auf dem Weltmarkt erhältlichen Quellen sinnvoll wäre. Es deutet sich jedoch an, dass ein Preis von etwa 150 € pro Kilogramm wie im Falle des GA<sub>3</sub> nicht im Bereich des Möglichen liegt. Dies ist jedoch auch nicht zwingend erforderlich, sofern spezifische Nutzenanwendungen der isolierten GAs bei hochpreisigen landwirtschaftlichen Kulturpflanzen erschlossen werden können.

### 4. Zusammenfassung und Fazit

In diesem dreijährigen Forschungsprojekt sollte in drei komplementär arbeitenden Forschungsstellen ein kostengünstiges Verfahren zur Gewinnung und Isolation von Gibberellinen erarbeitet werden, das eine breite Anwendungsforschung ermöglichen sollte und zugleich die Eignung der Gibberelline zur Steigerung des Energiepflanzenenertrags prüfen sollte.

Fo-St 1 hat in dieser Zeit durch molekularbiologisch/gentechnische Ansätze mehr als 40 neue Pilzstämme kreiert, von denen die besten Stämme nach Testung an Fo-St 2 übergeben wurden.

Bei den gentechnischen Manipulationen wurden verschiedene Ansätze erprobt:

- Überexpression von frühen Isoprenoid-Genen
- Überexpression von Gibberellin-Biosynthesegenen
- Ausschaltung von anderen Sekundärstoffwegen (insbesondere Pigmente)
- Beeinflussung der Regulation der Gibberellinbiosynthese
- Identifikation neuer Transkriptionsfaktoren der Gibberellin-Biosynthese

Als erfolgreichster Ansatz zeigte sich die Überexpression von *fpps*, die Ausschaltung von *ppt1* sowie die Verkürzung der HmgR um den regulatorischen transmembranen Teil. Dadurch konnte insgesamt eine Steigerung der GA Produktion um das Dreifache erzielt werden. Diese Stämme wurden in Fo-St 2 im Fermenter kultiviert und charakterisiert. Stämme mit Ausschaltung des Gens *ppt1* erwiesen sich als die besten, da sie keine Pigmente und kaum andere Nebenprodukte produzieren und weniger Kohlenstoff für die Produktion der GAs benötigen.

Der Zerfall der GAs stellte sich als einer der wichtigsten Einflussgrößen auf die Fermentation heraus. Da GA<sub>4</sub> wesentlich stabiler ist als GA<sub>3</sub> und GA<sub>7</sub>, muss das Fermentationsverfahren an das Zielgibberellin angepasst werden. So erreichen die GA<sub>4</sub>-Produzenten unter optimalen Bedingungen maximal 800 mg/l, während GA<sub>7</sub>-Produzenten zerfallsbedingt nur 400 mg/l erreichen.

Die wichtigste Prozessgröße für die Fermentation ist die initiale Stickstoffkonzentration, wie bereits durch Regulationsstudien in Fo-St 1 gezeigt. Der optimale pH-Wert der Fermentation lag bei pH 4, da der Zerfall aller GAs dort am niedrigsten war. Andere Fermentationsmethoden wie Kontinuierliche Kultur und Feststofffermentation wurden untersucht, aber erwiesen sich als eher ungeeignet.

Für die Extraktion der Gibberelline aus dem Kulturfiltrat eignen sich die Verfahren flüssig-flüssig Extraktion und Adsorption, wobei letztere einen höheren Reinigungseffekt bietet und wahrscheinlich kostengünstiger ist.

Für eine großflächige Ausbringung von Gibberellinen ist eine Blattapplikation sowohl wirksamer als auch ökonomisch sinnvoller als eine Bodeninjektion oder flächige Ausbringung auf den Boden mit anschließender Aufnahme über die Wurzel. Im Rahmen des Projekts wurde eine Blattdüngelösung erarbeitet, zu der das jeweilige Gibberellin zugesetzt wird. Die isolierten Gibberelline GA<sub>4</sub> und GA<sub>7</sub> unterscheiden sich entgegen der allgemeinen Annahme nicht grundsätzlich in ihrer Wirkdauer, jedoch in ihrer Wirkintensität. Mit Ausnahme von Chinaschilf konnte in allen übrigen geprüften Fällen mit GA<sub>7</sub> eine stärkere Reaktion erzielt werden als mit GA<sub>4</sub>.

In zahlreichen Feld- und Gefäßversuchen mit potentiellen Energiepflanzenarten konnte durch den Einsatz von Gibberellinen kein gesicherter Ertragszuwachs erzielt werden. Bei der Sonnenblume kam es zur Reifebeschleunigung durch GA<sub>7</sub>-Applikation.

#### Fazit:

**In Anbetracht der hohen Kosten für Fermentation, Aufreinigung der Gibberelline und der nicht signifikanten biologischen Effekte bei Gefäßversuchen und der zweijährigen Feldversuche kann derzeit eine Anwendung von Gibberellinen im Energiepflanzenanbau nicht empfohlen werden.**

#### 5. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Alle im Zeitraum durchgeführten experimentellen Arbeiten, Experimente, Fermentations-, Gewächshaus- und Freilandversuche waren für den Erfolg des Projekts notwendig und angemessen. Die Notwendigkeit der durchgeführten Arbeiten ergab sich aus wissenschaftlichen Überlegungen, die auf dem derzeitigen Wissenstand beruhen.

#### 6. Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft

	Ziel	Rahmen	Datum
<b>Maßnahme A: Weiterbildung/Transfer über PTS Fachveranst.</b>	Weiterbildung kleinerer Unternehmen	<b>A1:</b> Feldtag in Braunschweig	30.06.2010
<b>Maßnahme B: Forschungsforen; Konferenzen</b>	Transfer von Forschungsergebnissen in der Fachwelt	<b>B1</b> Deutsche Pflanzenbautagung Workshop „Bewertung von Bioenergieproduktionsverfahren“  <b>B2: Vortrag Frau Albermann</b> Institutskolloquium mit Gästen aus anderen Instituten des Fachbereichs Biologie  <b>B3: Europäische Pilzgenetik-Tagung Amsterdam</b> (Vortrag und Poster Prof. Tudzynski, Dr. Michilelse, Frau Albermann)	25.-27.09.2010  05.05.2010  April 2010
<b>Maßnahme A: Weiterbildung/Transfer über PTS Fachveranst.</b>	Transfer von Forschungsergebnissen in der Fachwelt	<b>A1:</b> INTERASPA Fachmesse; Posterpräsentation  <b>A2:</b> Feldtag in Braunschweig  <b>A3:</b> Pflanzenbautag in Kiel	12.01. - 13.01.2011  06.07.2011  27.-29.09.2011
<b>Maßnahme B: Forschungsforen; Konferenzen</b>	Transfer von Forschungsergebnissen in der Fachwelt	<b>B1:</b> Botaniker-Tagung Berlin: Vortrag Dr. Rühl, Frau Koltermann  <b>B2:</b> Forum Life Science 2011 TU München: Vortrag Tino Elter	18.-23. 09. 2011  23.-24.03.2011

		<p><b>B3:</b> Jahrestagung der VAAM (Vortrag)</p> <p><b>B4:</b> ESF Conference "Synthetic Biology of Antibiotic Production" St. Feliu de Guixols (Vortrag Frau Albermann)</p> <p><b>B4: Vortrag Frau Albermann</b> Institutskolloquium mit Gästen aus anderen Instituten des Fachbereichs Biologie</p> <p><b>B5:</b> Vorträge und Poster Prof. Dr. Bettina Tudzynski und Dr. Michielse „Fungal Genetics Conference Asilomar, California</p> <p><b>B6: Pflanzenbautagung</b></p>	<p>15-16.03.2011</p> <p>Oktober 2011</p> <p>13.04.2011</p> <p>März 2011</p> <p>Berlin 27-29.09.1011</p>
<b>Maßnahme C: Publikationen</b>	Rasche Verbreitung der experimentellen Daten in Fachzeitschriften	<b>C1:</b> Erarbeitung eines Manuskripts zur Charakterisierung von NpgA	Dezember 2011 (Wiemann et al., 2012, Plos One)
<b>Maßnahme D: Diskussionen mit dem PA</b>	Die Forschungsergebnisse sollen fortlaufend mit den Mitgliedern des PA diskutiert werden	<b>D1:</b> Jahrestreffen <b>D2:</b> telefonische Absprachen zu experimentellen Ansätzen	September 2011 Mai 2011 Oktober 2011
<b>Maßnahme B: Forschungsforen; Konferenzen</b>	Transfer von Forschungsergebnissen in der Fachwelt	<b>B1:</b> Europäischen Pilzgenetik-Tagung (ECFG): Plenarvortrag Prof. Tudzynski Poster Sabine Albermann <b>B2:</b> DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen und ProcessNet-Jahrestagung: Vortrag Tino Elter	März 2012 Marburg 12.09. 2012 Karlsruhe
<b>Maßnahme C: Publikationen</b>	Rasche Verbreitung der experimentellen Daten in Fachzeitschriften	<b>C1:</b> Erarbeitung eines Manuskripts zur Produktsteigerung Gibberelline:	Publiziert 2012: Albermann et al., Appl- Biotechnol. Microbiol.
<b>Maßnahme D: Diskussionen mit dem PA</b>	Die Forschungsergebnisse sollen fortlaufend mit den Mitgliedern des PA diskutiert werden	<b>D1:</b> Jahrestreffen <b>D2:</b> telefonische Absprachen zu experimentellen Ansätzen	September 2012 Über das gesamte Jahr

#### Publikationen:

**Albermann S.**, Linnemannstöns P., Tudzynski B. 2012. Strategies for strain improvement in *Fusarium fujikuroi*: overexpression and localization of key enzymes of the isoprenoid pathway and their impact on gibberellin biosynthesis. Appl Microbiol Biotechnol. [Epub ahead of print]

**Wiemann P, Albermann S, Niehaus EM, Studt L, von Bargen KW, Brock NL, Humpf HU, Dickschat JS, Tudzynski B.** 2012. The Sfp-type 4'-phosphopantetheinyl transferase Ppt1 of *Fusarium fujikuroi* controls development, secondary metabolism and pathogenicity. PLoS One. 2012;7(5):e37519.

**Albermann, S., Elter, T., Koltermann, D., Teubner, A., Krischke, W., Hirth, T., Rühl, G., and Tudzynski, B.** 2012. Production and application of specific gibberellins obtained by different wild-type strains and novel mutants of *Fusarium fujikuroi*. Appl. Environm. Microbiol. Submitted.

## 7. Anhang

**Tab 4:** Übersicht aller für dieses Forschungsprojekt von Fo-St 1 hergestellten Stämme und deren Charakteristika

Nr	Stammbezeichnung	Ausgangsstamm	genetische Veränderung	GA-Menge im Vergleich zum Ausgangsstamm (HPLC)	Expression (Northern Analyse)	an Fo-Stelle 2 mit Nr. X	Besondere Eigenschaften
1	IMI58289 (S1)		keine			1	
2	m567		keine			2	
3	6314 (+N)	m567	UV-Mutation im letzten Biosynthesegen <i>P450-3</i> (13-Hydroxylase)	↑		3	
4	S1/Δdes	S1	Ausaltung der Desaturase ( <i>des</i> )	↑		4	Produktion von GA <sub>1</sub>
5	6314/Δdes T1, T2 + T8	6314 (+N)	Ausaltung der Desaturase	↑		5, 6 + 7	Produktion von GA <sub>4</sub>
6	6314/cos42	6314 (+N)	zusätzliche Kopie von <i>ggs2</i> und <i>cps/ks</i>	↑		8	
7	S1/Δbik1	S1	Ausaltung des Bikaverin-Synthese-Gens <i>bik1</i>	↑		10	keine Pigmentbildung
8	6314/Δbik1	6314 (+N)	Ausaltung des Bikaverin-Synthese-Gens <i>bik1</i>	↑		11	keine Pigmentbildung
9	OE::FppS T1	m567	Überexpression von <i>fppS</i>	→	↑ <i>fppS</i>		
10	OE::FppS + OE::HmgR T2.9	m567	Überexpression von <i>fppS</i> und <i>hmgR</i>	ca. 90 %	↑ <i>fppS</i> + ↑ <i>hmgR</i>		
11	FppS-GFP	m567	Expression eines <i>fppS</i> -GFP-Fusionsproteins	→			leuchtet nicht spezifisch
12	KT1 (T2,3,4,6+9)	6314 (-N)	Überexpression der zytosolischen Domäne von <i>hmG</i> aus <i>A. thaliana</i>	→	↑ <i>cps/ks</i> (außer T4)		heterologe Expression
13	KT2 (T1,2,3,5+6)	6314 (-N)	Überexpression der zytosolischen Domäne (mit mutiertem Serin) von <i>hmG</i> aus <i>A. thaliana</i>	→	↑ <i>cps/ks</i> (außer T4)		heterologe Expression
14	tHmgR T 1, 3 +4	6314 (-N)	Überexpression der zytosolischen Domäne von <i>hmgR</i>	ca. 300 % ↑	↑ <i>hmgR</i> in T1+4		
15	OE::Ggs2 (von SR)	6314 (-N)	Überexpression von <i>ggs2</i>	ca. 150 % ↑			
16	OE::Ggs2 (von SR)	6314 (-N)	Überexpression von <i>ggs2</i>	→			
17	OE::Ggs2 (T6+7)	6314/Δbik1	Überexpression von <i>ggs2</i>	ca. 150 % ↑	T7: ↑ <i>ggs2</i> ↑ <i>cps/ks</i>		keine Pigmentbildung
18	OE::tHmgR+OE::FppS+OE::Ggs2 (T3)	6314/Δbik1	Überexpression von <i>ggs2</i> , <i>fppS</i> und <i>thmgR</i>	→	↑ <i>ggs2</i> ↑ <i>cps/ks</i>	12	keine Pigmentbildung
19	OE::tHmgR+OE::Ggs2 (T4+5, T7.1+9.1)	6314/Δbik1	Überexpression von <i>ggs2</i> und <i>thmgR</i>	→	↑ <i>ggs2</i>	13 (T 7.1)	keine Pigmentbildung
20	OE::FppS + OE::Ggs2 (T 11.1 + 12.1)	6314/Δbik1	Überexpression von <i>ggs2</i> und <i>fppS</i>	→		14 (T 11.1)	keine Pigmentbildung

21	6314/Δdes/ppt1 (T2)	6314/Δdes	Ausschaltung von <i>ppt1</i>	↑	↑ <i>ggs2</i> ↑ <i>cps/ks</i>	15	keine Pigmentbildung, keine Mykotoxin-Bildung
22	Δatf1	6314 (-N)	Ausschaltung von <i>atf1</i> (bZIP-Transkriptionsfaktor)	ca. 50 % ↓	↓ <i>ggs2</i> ↓ <i>cps/ks</i>		
23	Δscap	6314 (-N)	Ausschaltung des putativen <i>scap</i> -Homolog	→			
24	Δinsig	6314 (-N)	Ausschaltung des putativen <i>insig</i> -Homolog	→			
<b>Nr</b>	<b>Stammebezeichnung</b>	<b>Ausgangsstamm</b>	<b>genetische Veränderung</b>	<b>GA-Menge im Vergleich zum Ausgangsstamm (HPLC)</b>	<b>Expression (Northern Analyse)</b>	<b>an Fo-Stelle 2 mit Nr. X</b>	<b>Besondere Eigenschaften</b>
25	Δppt1 (T4)	6314 (-N)	Ausschaltung von <i>ppt1</i>	↑	↑ <i>ggs2</i> ↑ <i>cps/ks</i>	16	
26	OE::Atf1	S1	Überexpression von <i>atf1</i>	→			
27	Δatf1	S1	Ausschaltung von <i>atf1</i>	ca. 50 % ↓			
28	ΔflbC1 T1.2, T2.2 + T3.2	S1	Ausschaltung des Transkriptionsfaktors <i>flbC</i>	ca. 150 % ↑	↑ <i>ggs2</i>		
29	OE::FlbC T7	S1	Überexpression von <i>flbC</i>	→			
30	OE::FlbC T3	6314/Δdes	Überexpression von <i>flbC</i>	→			
31	tHmgR/OE::Ggs2 T11	6314/tHmgR T1	Überexpression von <i>thmgR</i> und <i>ggs2</i>	→			
32	tHmgR/Δppt1 T5	6314/tHmgR T1	Überexpression von <i>thmgR</i> und Ausschaltung von <i>ppt1</i>	→		17	keine Pigmentbildung, keine Mykotoxin-Bildung
33	Δdes/OE::Ggs2 T4.6, T5.1 + T8.1	6314/Δdes	Überexpression von <i>ggs2</i>	ca. 150 % ↑			
34	6314/Δppt1 T3.1	6314 (+N)	Ausschaltung von <i>ppt1</i>	→	↑ <i>ggs2</i> ↑ <i>cps/ks</i>	18	keine Pigmentbildung, keine Mykotoxin-Bildung
35	6314/Δdes/KT1 T4	6314/Δdes	Überexpression der zytosolischen Domäne von <i>hmG</i> aus <i>A. thaliana</i>	c			heterologe Expression
36	S1/Δatf1 T1, 2 + 3	S1	Ausschaltung von <i>atf1</i>	ca. 50 % ↓	↓ <i>ggs2</i> ↓ <i>cps/ks</i>		
37	S1/Δsak1	S1	Ausschaltung der MAP-Kinase <i>sak1</i>	ca. 200 % ↑			
38	<i>ggs2</i> -gfp T1 + T13	S1	<i>Ggs2</i> -GFP-Fusions-Protein				lokalisiert in kleinen Organellen
39	<i>cps/ks</i> -mcherry T1 + 4	S1	<i>Cps/ks</i> -mcherry-Fusions-Protein				lokalisiert im Zytosol
40	<i>hmgR</i> -GFP	S1	<i>HmgR</i> -GFP-Fusions-Protein				lokalisiert in der ER-Membran
41	<i>ggs2</i> -gfp/mcherry-SKL T1 + T4	<i>ggs2</i> -gfp T1	<i>Ggs2</i> -GFP-Fusions-Protein + mcherry-SKL (Peroxisomen-Lokalisierungssignal)				keine Co-lokalisierung
42	AnHmG T2, 3 + 5	6314 (-N)	Überexpression der <i>hmG</i> aus <i>A. nidulans</i>	→			heterologe Expression
43	<i>hmgR</i> <sub>297K→R</sub>	6314 (-N)	Punktmutation des Lysins 297 (putative Ubiquitinylierungsstelle)	→			
44	S1/Δsrebp	S1	Ausschaltung des Transkriptionsfaktors <i>srebp</i> (putativer Regulator der <i>HmgR</i> )	ca. 150 % ↑			
45	S1/OE::Srebp	S1	Überexpression von <i>srebp</i>	→			

## **Danksagung**

Wir danken der Arbeitsgemeinschaft Industrieller Forschungsvereinigungen "Otto von Guericke" e.V. (AiF) (AiF-Nr. N16001) für die finanzielle Förderung der Arbeiten, die aus Mitteln des Bundesministeriums für Wirtschaft und Technologie (BMWi) erfolgte.