

Aus dem Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Identifikation und Charakterisierung von Genen der Tocopherol-Biosynthese aus Raps (*Brassica napus* L.)

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



vorgelegt von
Dipl.-Biol. Jessica Endrigkeit
aus Hamburg

Kiel, 2007

Referent: Prof. Dr. Christian Jung
Korreferentin: Prof. Dr. Karin Krupinska
Tag der mündlichen Prüfung: 05.11.2007
Zum Druck genehmigt: Kiel, 05.02.2008

Der Dekan

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungen	VI
Tabellen	IX
Abbildungen	XI
1. Einleitung	1
1.1. Biologie, züchterische Bearbeitung und Nutzung von Raps	1
1.2. Genomforschung und genetische Ressourcen	2
1.3. Synthese und Funktion der Tocochromanole	3
1.3.1. Die Synthese und Akkumulation von Tocochromanolen in Pflanzen	4
1.3.2. Bedeutung der Tocochromanole für die Pflanze	7
1.3.3. Bedeutung der Tocochromanole für die menschliche Ernährung	8
1.3.4. Untersuchungen zur Tocopherolakkumulation in Raps	9
1.4. Arbeitshypothesen und Ziele	10
2. Material und Methoden	12
2.1. Chemikalien, DNA-Mengen- und Größenstandards, Enzyme und <i>Kits</i>	12
2.2. DNA-Klone, Sonden und Oligonukleotide	15
2.3. Bakterienstämme	18
2.4. Pflanzenmaterial	18
2.5. Molekulare Standardmethoden	18
2.5.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	18
2.5.2. DNA-Gelelektrophorese	19
2.5.3. DNA-Sequenzierung	19
2.5.4. Isolation genomischer DNA aus pflanzlichem Gewebe	19
2.5.5. Plasmidklonierung	20
2.5.6. Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i>	21
2.5.7. Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien	22
2.5.8. Southern-Analyse	22
2.5.9. Isolation von Gesamt-RNA	23
2.5.10. RNA-Gelelektrophorese	23
2.5.11. Synthese von cDNA über RT-PCR	24
2.6. RACE-Methode	24
2.7. Entwicklung von CAPS (<i>Cleaved amplified polymorphic sequence</i>) Markern	24
2.8. Verwendete Software	25
2.9. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> vermittelter Gentransfer in <i>A. thaliana</i>	25
2.10. HPLC-Methode zur Bestimmung des Tocopherol-Gehaltes	27
3. Ergebnisse	29
3.1. Bestimmung des Tocopherol-Gehaltes in Rapssamen	29
3.2. Isolierung und Charakterisierung von <i>B. napus</i> Sequenzen mit Homologie zu den <i>A. thaliana</i> Genen <i>PDS1</i> , <i>VTE4</i> und <i>APG1</i>	30
3.2.1. Isolierung und Charakterisierung von <i>B. napus</i> Sequenzen mit Homologie zum <i>A.</i> <i>thaliana</i> Gen <i>PDS1</i>	31
3.2.1.1. PCR Experimente zur Isolierung von <i>B. napus</i> Sequenzen mit Homologie zum <i>A.</i> <i>thaliana</i> Gen <i>PDS1</i>	33
3.2.1.2. Untersuchungen zur Expression des <i>BnPDS1</i> Gens	37
3.2.1.3. Southern-Analyse zur Bestimmung der Kopienzahl von <i>PDS1</i> -Homologen im Rapsgenom	38
3.2.2. Isolierung und Charakterisierung von <i>B. napus</i> Sequenzen mit Homologie zum <i>A.</i> <i>thaliana</i> Gen <i>VTE4</i>	39
3.2.2.1. PCR Experimente zur Isolierung von <i>B. napus</i> Sequenzen mit Homologie zum <i>A.</i> <i>thaliana</i> Gen <i>VTE4</i>	41

3.2.2.2.	Identifikation der <i>BnVTE4</i> Volllänge-Sequenz mittels 5' und 3' RACE	43
3.2.2.3.	Molekulare Charakterisierung der <i>BnVTE4</i> Sequenzen	46
3.2.2.4.	Untersuchungen zur Expression der <i>BnVTE4</i> Sequenz	48
3.2.2.5.	Southern-Analyse zur Bestimmung der Kopienzahl von <i>VTE4</i> -Homologen im Raps-Genom	50
3.2.2.6.	Funktionsanalyse der Sequenz <i>BnVTE4-1</i> durch konstitutive Expression in <i>A. thaliana</i>	51
3.2.3.	Isolierung und Charakterisierung von <i>B. napus</i> Sequenzen mit Homologie zum <i>A. thaliana</i> Gen <i>APG1</i>	54
3.2.3.1.	Molekulare Charakterisierung der <i>BnAPG1</i> Sequenz	56
3.2.3.2.	Untersuchungen zur Expression des <i>BnAPG1</i> Gens	58
3.2.3.3.	Southern-Analyse zur Bestimmung der Kopienzahl von <i>APG1</i> -Homologen im Raps-Genom	60
3.2.3.4.	Genetische Kartierung der <i>BnAPG1</i> Sequenz	61
3.2.3.5.	Funktionsanalyse des <i>BnAPG1</i> -Gens mittels konstitutiver Expression in <i>A. thaliana</i> ..	63
4.	Diskussion	67
4.1.	Vergleichende Bewertung der Tocopherol-Bestimmung von <i>B. napus</i>	67
4.2.	Klonierung von Genen der Tocopherolbiosynthese aus Raps und anderen Arten	69
4.3.	Wie viele Kopien der Tocopherolbiosynthese-Gene liegen im Raps-Genom vor?	72
4.4.	Gene der Tocopherol-Biosynthese als funktionelle Marker für die Grundlagenforschung und für die züchterische Anwendung	74
4.5.	Perspektiven für die Züchtung von Raps-Sorten mit veränderten Tocopherolgehalten ..	76
5.	Zusammenfassung	78
6.	Summary	80
7.	Literaturverzeichnis	82
	Danksagung	96
	Lebenslauf	97

Abkürzungen

2ip	2-Isopentenyladenin
A	Adenin-Nukleotid
ACGM	<i>amplified consensus marker gene</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BBSRC	Biotechnology and Biological Sciences Research Council
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serumalbumin
C	Cytosin-Nukleotid
CAPS	<i>cleaved amplified polymorphic sequence</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDS	coding sequences
CIM	Kallusinduktions-Medium
cM	centiMorgan
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DH	Doppel-Haploid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribunukleinsäure
dNTPs	desoxy-Nuklotide
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	<i>expressed sequence tag</i>
EU	Europäische Union
FAO	Food and Agriculture Organization of The United Nations
G	Guanin-Nukleotid
GSS	<i>genomic survey sequences</i>

H ₂ O	Wasser
HGGT	Homogentisat-Geranylgeranyl-Transferase
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IAA	Indol-3-Essigsäure
IBA	Indol-3-Buttersäure
k.A.	keine Angabe
kbp	Kilobasenpaare
MAS	<i>marker assisted selection</i>
MPBQ	2-Methyl-6-phytyl-1,4-benzoquinon
ORF	<i>open reading frame</i>
p.a.	pro analysi
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
ppm	parts per million
PVP	Polyvinylpyrrolidon
QTL	<i>quantitative trait loci</i>
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RIM	Wurzelinduktions-Medium
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SAM	S-adenosylmethionin
SAP	<i>Shrimp alkaline phosphatase</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Sprosselongations-Medium
SIM	Sprossinduktions-Medium
SSCP	<i>single strand conformation polymorphism</i>
ssp.	Subspecies
SSR	<i>short sequence repeats</i>
T	Thymin-Nukleotid
T0	transgene Primärgeneration

TILLING	<i>targeting induced local lesions in genomes</i>
U	<i>Unit</i>
UTR	<i>untranslated regions</i>
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent

Tabellen

Tabelle 1: Übersicht der an der Tocopherolsynthese direkt beteiligten Enzyme und die hierfür in <i>A. thaliana</i> kodierenden Gene.	6
Tabelle 2: Übersicht der Tocochromanol-Gehalte verschiedener Pflanzenöle und Nüsse.	8
Tabelle 3: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.....	12
Tabelle 4: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten <i>Kits</i>	14
Tabelle 5: Übersicht der in dieser Arbeit zur Abschätzung von DNA-Fragmenten verwendeten Längen- und Mengenstandards.....	15
Tabelle 6: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme	15
Tabelle 7: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Sonden für die Southern-Hybridisierung.....	15
Tabelle 8: Übersicht der erstellten und verwendeten DNA-Klone und der sequenzierten PCR-Produkte	16
Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide (Primer).	17
Tabelle 10: Übersicht der zur Klonierung und Transformation verwendeten Bakterienstämme	18
Tabelle 11: Volllängen cDNA-Sequenzen des <i>A. thaliana</i> -Gens <i>PDS1</i> sowie homologer Sequenzen weiterer Pflanzenarten und genomische Sequenz der <i>pds1</i> -Mutante aus <i>A. thaliana</i>	32
Tabelle 12: Übersicht der hier klonierten Raps Sequenzen mit Homologie zum <i>A. thaliana</i> Gen <i>PDS1</i>	35
Tabelle 13: Übersicht der <i>B. napus</i> ESTs mit Homologie zum <i>PDS1</i> Gen.....	38
Tabelle 14: Volllängen cDNA-Sequenzen des <i>A. thaliana</i> -Gens <i>VTE4</i> sowie homologer Sequenzen weiterer Pflanzenarten.	40
Tabelle 15: Übersicht der hier ermittelten genomischen Sequenzen aus <i>B. napus</i> mit Homologie zum <i>A. thaliana</i> Gen <i>VTE4</i>	43
Tabelle 16: Homologie zwischen <i>BnVTE4-1</i> , <i>BnVTE4-2</i> , <i>BnVTE4-3</i> , <i>BnVTE4-4</i> , der aus der RACE-Reaktion abgeleiteten Sequenz (RACE Kons.) und der <i>A. thaliana</i> cDNA.	46
Tabelle 17: Übersicht der <i>B. napus</i> ESTs mit Homologie zum <i>VTE4</i> Gen.....	49
Tabelle 18: Tocopherolgehalte der Samen von nicht transformierten <i>A. thaliana</i> Kontroll-Pflanzen und die <i>BnVTE4-1</i> -tragenden Transformanden	53
Tabelle 19: Volllängen cDNA-Sequenzen des <i>A. thaliana</i> -Gens <i>APG1</i> sowie homologer Sequenzen weiterer Pflanzenarten.	55
Tabelle 20: Übersicht der <i>B. napus</i> ESTs mit Homologie zum <i>APG1</i> Gen.....	59
Tabelle 21: Ergebnisse der HPLC-Messung zur Bestimmung der Tocopherolgehalte von T1 Samen der das <i>BnAPG1</i> -Gen tragenden Transformanden im Vergleich zu nicht transformierten Kontrollpflanzen.	65

Tabelle 22: Übersicht der ermittelten und in der Literatur angegebenen Variationsbreite des Tocopherolgehalts von Rapssamen.	67
Tabelle 23: Übersicht klonierter pflanzlicher Tocopherol-Gene mit nachgewiesener Funktion.....	70
Tabelle 24: Übersicht des von der NPZ (Holtsee) zur Tocopherolanalytik zur Verfügung gestellten Saatguts.....	91
Tabelle 25: Übersicht der zur Kartierung des <i>apg1</i> -Markers verwendeten DH-Linien.....	94
Tabelle 26: Analyse der <i>BnVTE4</i> cDNA Klone..	95

Abbildungen

Abbildung 1: Strukturen der Tocopherol- und Tocotrienolverbindungen.....	4
Abbildung 2: Der Tocopherol-Biosyntheseweg der Pflanzen.....	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung von α -Tocopherol als Antioxidans.....	7
Abbildung 4: Der Klonierungsvektor pGEM®T	21
Abbildung 5: Der binäre Vektor pAM194	21
Abbildung 6: Beispiel eines HPLC-Chromatogramms des Tocochromanol-Standards.	28
Abbildung 7: Tocopherol-Untersuchungen in 58 Winterraps- und 18 Sommerraps-Herkünften.	30
Abbildung 8: Lage und Überprüfung der Primer zur Amplifizierung von <i>B. napus</i> Sequenzen mit Homologie zum <i>A. thaliana</i> Gen <i>PDS1</i>	34
Abbildung 9: Vergleich der abgeleiteten BnPDS1 Aminosäuresequenz mit der Sequenz der <i>A. thaliana</i> HPPD (<i>AthPDS1</i>).	36
Abbildung 10: Phylogenetischer Baum verschiedener pflanzlicher cDNA Vollängensequenzen (vergl. Tabelle 11) mit Homologie zum <i>PDS1</i> -Gen sowie der hier klonierten Sequenz <i>BnPDS1</i>	36
Abbildung 11: Gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR-Produkte im 1 %igen Agarosegel bei 60V für 60 Minuten. Die PCR Reaktion erfolgte mit den Primern pds 1fw und pds 1rv.	37
Abbildung 12: Southern-Hybridisierung der Sonde BnPDS1-750 mit genomischer Raps-DNA.....	39
Abbildung 13: Lage und Überprüfung der Primer zur Amplifizierung von <i>B. napus</i> Sequenzen mit Homologie zum <i>A. thaliana</i> Gen <i>VTE4</i>	41
Abbildung 14: 5' und 3' RACE der <i>BnVTE4</i> Sequenz.	44
Abbildung 15: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate in einem 1 %igen Agarosegel bei 60 V für 90 bzw. 60 Minuten. Die PCR erfolgte mit den Primern vte4 3fw und vte4 3rv	45
Abbildung 16: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von BnVTE4-1, BnVTE4-2, BnVTE4-3 und BnVTE4-4 mit der Sequenz des <i>A. thaliana</i> VTE4 Proteins(<i>AthVTE4</i>)..	47
Abbildung 17: Phylogenetischer Baum verschiedener pflanzlicher cDNA Vollängen-Sequenzen (Tabelle 14) mit Homologie zum <i>VTE4</i> -Gen sowie der hier klonierten Sequenz <i>BnVTE4</i> Sequenzen.	48
Abbildung 18: Gelelektrophoretischen Auftrennung der RT-PCR Amplifikate im 1 %igen Agarosegel bei 60 V für 60 Minuten. Die RT-PCR erfolgte mit den Primern vte4 2fw und vte4 2rv	49
Abbildung 19: Southern-Hybridisierung der Sonde <i>BnVTE4</i> -1000 mit genomischer Raps-DNA t.	50
Abbildung 20: Erstellung des Konstrukts pAM194_ <i>BnVTE4</i> -1	52
Abbildung 21: Mittlere Tocopherolgehalte und Standardfehler der T1 Samen die auf drei T0 Pflanzen geerntet worden waren im Vergleich zu untransformierten Kontrollpflanzen.	54

Abbildung 22: Lage und Überprüfung der Primer zur Amplifizierung von <i>B. napus</i> Sequenzen mit Homologie zum <i>A. thaliana</i> Gen <i>APG1</i> .	56
Abbildung 23: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von BnAPG1 mit der Sequenz des <i>A. thaliana</i> APG1 Proteins(AthAPG1).	57
Abbildung 24: Phylogenetischer Baum verschiedener pflanzlicher cDNA Sequenzen (Tabelle 19) mit Homologie zum <i>APG1</i> -Gen sowie der hier klonierten Sequenz <i>BnAPG1</i> .	58
Abbildung 25: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte mit den Primern apg 1fw und apg 1rv	58
Abbildung 26: Southern-Hybridisierung der Sonde <i>BnAPG1</i> mit genomischer Raps-DNA.	60
Abbildung 27: Gelelektrophoretische Auftrennung mit <i>KpnI</i> restringierter PCR-Amplifikate aus einer PCR mit den Primern apg 1fw und apg 1rv im 2 %igen Agarosegel	61
Abbildung 28: Markerkarte der Kopplungsgruppe 3 (entspricht Rapschromosom N07) der Kartierungspopulation „Mansholts Hamburger Raps“ x „Samourai“. Die Karte zeigt die Position des Markers apg1, sowie die Position eines früher publizierten QTL für α -Tocopherol-Gehalt. Die Karte wurde unter Verwendung der Kosambi Kartierungsfunktion erstellt.	62
Abbildung 29: Das Konstrukt pAM194_ <i>BnAPG1</i> .	64
Abbildung 30: Mittelwerte und Standardfehler der Tocopherolgehalte der T1 Samen geerntet auf sechs T0 von <i>BnAPG1</i> -Transformanten im Vergleich zu untransformierten Kontrollpflanzen.	66
Abbildung 31: Vergleich der <i>BnPDS1</i> Sequenzen mit öffentlichen ESTs und der <i>A. thaliana</i> Sequenz <i>PDS1</i>	91
Abbildung 32: Vergleich der <i>BnVTE4-1000</i> Sequenz mit der <i>A. thaliana VTE4</i> Sequenz.	91
Abbildung 33: Vergleich der <i>BnVTE4-750</i> Sequenzen mit der <i>A. thaliana VTE4</i> Sequenz.	91
Abbildung 34: Sequenzvergleich der 39 <i>BnVTE4</i> cDNA-Klone zur Bestimmung der <i>BnVTE4</i> Vollängen-Sequenzen	91
Abbildung 35: Vergleich der Sequenzen <i>BnVTE4-1</i> , <i>BnVTE4-2</i> , <i>BnVTE4-3</i> , <i>BnVTE4-4</i> mit öffentlichen ESTs und der <i>A. thaliana VTE4</i> Sequenz.	91
Abbildung 36: Vergleich der Sequenz <i>BnAPG1</i> mit öffentlichen ESTs und der <i>A. thaliana</i> Sequenz <i>APG1</i>	91

1. Einleitung

1.1. Biologie, züchterische Bearbeitung und Nutzung von Raps

Raps (*Brassica napus* ssp. *oleifera* L.) gehört zu der circa 3000 Arten umfassenden Familie der *Brassicaceae*. In dieser Familie ist, neben allen Kohlarten, Senf, Rübsen und Rettich, die in der Molekularbiologie als Modellpflanze verwendete Art *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. zu finden. Raps ist ein Selbstbefruchter mit einem Anteil von 10 % - 50 % Fremdbefruchtung (Becker et al. 1992). Raps ist eine allotetraploide Art mit einem Chromosomensatz von $2n = 38$ und entstand im Mittelmeerraum durch spontane Kreuzung von *B. oleracea* ($n = 9$) und *B. rapa* (syn. *B. campestris*) ($n = 10$) (U 1935).

Die Blätter der Rapspflanzen stehen wechselständig. Die Blüten, die in lockeren, traubenartigen Blütenständen angeordnet sind, blühen von oben nach unten ab. Sie enthalten vier Kelchblätter und vier auf Lücke und über Kreuz stehende Kronblätter sowie vier lange und zwei kurze Staubblätter in zwei Kreisen. Der oberständige Fruchtknoten besteht aus zwei Fruchtblättern, zwischen denen eine falsche Scheidewand eingezogen ist. Die Früchte sind 5-10 cm lange Schoten, welche die gelben, braunen oder meist schwarzen Samen enthalten. Die Samen sind zur Reife komplett vom Embryo ausgefüllt. Rapssamen setzen sich im wesentlichen aus den Bestandteilen Öl (40 % – 48 %), Protein (20 % – 30 %) und Rohfaser (12 % – 14 %) zusammen (Lühs et al. 2000). Des weiteren enthalten sie Wasser (bis 9 %), Phytinsäure (2 % – 5 %), Tannine (1,5 % – 3 %), Sinapin (1 % – 2 %), Glucosinolate und Tocopherole (Lühs et al. 2000).

Generell werden zwei Typen von Raps unterschieden. Sommerraps (*B. napus* ssp. *oleifera* forma *annua*) wird im Frühling ausgesät und im Spätsommer geerntet. Winterraps (*B. napus* ssp. *oleifera* forma *biennis*) wird im Spätsommer ausgesät und im Sommer des darauffolgenden Jahres geerntet. In Deutschland wird wegen des höheren Ertrags hauptsächlich Winterraps angebaut, weltweit hingegen wird wegen der Frostanfälligkeit des Winterrapses überwiegend Sommerraps genutzt.

Raps war im Jahr 2006 laut der FAOSTAT Datenbank die bedeutendste in Deutschland angebaute Ölpflanze mit einer Anbaufläche von 1,43 Mio. ha. In der Welt nahm Deutschland mit dieser Anbaufläche die vierte Position hinter China, Indien und Kanada ein (<http://faostat.fao.org/>). Erste Berichte über die Kultivierung von Raps gehen auf das 13. Jahrhundert zurück (Appelqvist 1972). Anfänglich wurde Rapsöl als Lampenöl verwendet, da es durch den hohen Anteil an Erucasäure als Speiseöl nicht verwendet werden konnte (Appelqvist 1972). Erst durch die Entdeckung der erucasäurefreien Mutante „Liho“ 1960 und der glucosinolatarmen Sorte „Bronowski“ 1967 konnte in den 1970er Jahren durch züchterische Bearbeitung der Gehalt an Erucasäure und Glucosinolaten soweit gesenkt werden, dass das Rapsöl als wertvolles und geschmacklich ansprechendes Speiseöl eingesetzt werden konnte (Röbbelen 1973). Die Sorten, deren Erucasäuregehalt bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt unter 2 % liegt

und deren Glucosinolatgehalte im Mehl unter 30 $\mu\text{mol/g}$ aufweisen, werden als „Doppel-Null“(00)- Sorten bezeichnet (CODEX 1999).

Raps wird vielfältig genutzt. Im Jahr 2006 wurde Raps zu 70 % für die Biodieselproduktion, zu 23 % für die Nahrungsmittelindustrie und zu 7 % für weitere industrielle Zwecke angebaut. Die Proteinfraction, die nach dem Abpressen des Rapsöls verbleibt, wird in der Futtermittelindustrie verwendet.

Hauptziele der modernen Rapszüchtung sind die Erhöhung des Öl- und Rohproteinanteils, die Reduzierung wertmindernder Inhaltsstoffe wie z.B. des Rohfaseranteils und der Sinapingehalte sowie die Entwicklung von Rapsorten mit speziellen Ölqualitäten (Lühs et al. 2000). Weitere Zuchtziele liegen in der Erhöhung wertsteigernder Minorkomponenten und in der Ertragssicherung (www.dgfett.de/meetings/archiv/hagen2005/leckband.pdf). Neben der konventionellen Züchtung gibt es die Möglichkeit Raps gentechnisch zu bearbeiten. Über die *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Transformation ist es möglich DNA-Fragmente in das Rapsgenom zu integrieren (Moghaieb et al. 2006). Weltweit sind einige gentechnisch hergestellte Rapsorten zugelassen. In Europa ist das in Verkehr bringen von sieben GVO zugelassen, in den USA, Kanada und Japan jeweils von zehn, in Australien von fünf, in den Philippinen von zwei und in China von einem. Allerdings wird nur in Kanada und den USA kommerziell gentechnisch veränderter, herbizidtoleranter Raps angebaut, und zwar im Jahr 2006 auf 75 % der Gesamtanbaufläche. Die Zuchtziele liegen weltweit im Wesentlichen in der veränderten Ölzusammensetzung, in der Herbizidtoleranz, der Pilzresistenz und der männlichen Sterilität (www.transgen.de).

1.2. Genomforschung und genetische Ressourcen

Das circa 1200 Mb umfassende Rapsgenom (Arumuganathan und Earle 1991) verteilt sich auf 19 Chromosomen die mit N01-N19 bezeichnet werden. Die Chromosomen N01-N10 stammen aus *B. rapa* (A-Genom) und die Chromosomen N11-19 aus *B. oleracea* (C-Genom). In den letzten Jahren wurden zahlreiche Syntheniestudien zu *A. thaliana* durchgeführt (Fourman et al. 2002, Lagercrantz 1998, Li et al. 2003, Lukens et al. 2003, Parkin et al. 2002, Parkin et al. 2005, Paterson et al. 2001). Calell et al. (1998) und Parkin et al. (2002) konnten zeigen, dass zahlreiche Regionen des Arabidopsis Genoms in dreifacher Kopie in den A, B und C Grundgenomen vorkommen. Untereinander sind die Grundgenome von *B. rapa*, *B. oleracea* und *B. nigra*, mit Ausnahme einzelner Bereiche, trotz unterschiedlicher Chromosomenanzahl kollinear (Kowalski et al. 1994, Lagercrantz 1998, Lagercrantz und Lydiat 1996). Diese Tatsache zeigt, dass es zu homoeologer Rekombination und somit zum interspezifischen Gentransfer kommen kann. Mackay (1973) zeigte die Möglichkeit der interspezifischen Hybridisierung zwischen *B. napus* und *B. rapa*. Tatsächlich kann Raps mit einer Vielzahl verwandter Arten fertile Hybride bilden. Die hierzu erfolgten Studien sind bei FitzJohn et al. (2007) zusammengefasst. Weiter ist es möglich, den relativ begrenzten

Genpool von *B. napus* durch sogenannten Resyntheseraps (fertile Hybride zwischen *B. oleracea* und *B. rapa*) aufzufüllen (Lühs et al. 1998, Seyis et al. 2003). Durch die Auswahl geeigneter *Brassica* Sorten können so gentechnikfrei wertvolle Eigenschaften der Grundarten, wie z. B. Resistenzen, auf *B. napus* übertragen werden.

Weltweit wurden in den letzten Jahren zahlreiche Projekte initiiert, die sich mit dem Erhalt und der Erweiterung der genetischen Ressourcen sowie der Erforschung des Genoms beschäftigen. Diese sind zu einem großen Teil in dem „Multinational *Brassica* Genome Project“ organisiert (www.brassica.info), an dem Partner aus der EU, China, Kanada, Korea und Australien beteiligt sind. Des Weiteren sei auf das französische Projekt „Genoplante“ (www.genoplante.com) und das EU Projekt „RESGEN CT99 109-112“ (<http://documents.plant.wur.nl/cgn/pgr/brasedb/brasresgen.htm>) verwiesen.

Für Raps sind eine Reihe von genetischen Karten publiziert. Diese wurden mit Hilfe verschiedener molekularer Marker erstellt und weisen Längen zwischen 1400 cM und 2690 cM auf (Delourme et al. 2006, Landry et al. 2006, Lowe et al. 2004, Parkin et al. 2005, Piquemal et al. 2005). Für die physische Kartierung stehen eine Reihe von BAC (*bacterial artificial chromosome*)-Banken mit 73.000 bis 111.000 Klonen und durchschnittlichen Insertionsgrößen von 85 kb bis 200 kb zur Verfügung (Wu et al. 2000, <http://jicgenomelab.co.uk/libraries.html>, www.brassica.info).

Durch weltweite Projekte und immer leistungsfähigere Hochdurchsatzmethoden stehen in öffentlichen Datenbanken eine wachsende Anzahl von Sequenzen zur Verfügung. Diese sind im wesentlichen exprimierte Sequenzen (ESTs) und kodierende Sequenzen (CDS) aus cDNA-Banken sowie Gene und genomische Sequenzen (GSSs) aus BAC-Banken und Genomprojekten. In der NCBI-Datenbank dbEST waren im April 2007 für *B. napus* 148.774 ESTs hinterlegt. Im August 2007 waren es bereits über 560.000 ESTs und über 13.000 GSS. Diese stehen zum Sequenzvergleich in der Datenbank „BrassicaDB“ zur Verfügung (www.brassica.info). Die „MapViewer“-Funktion der NCBI Datenbank ermöglicht es die Positionen öffentlicher Marker auf 6 verschiedenen *B. napus* Karten für jedes Chromosom zu ermitteln (www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?taxid=3708). Ein Grossteil der Informationen stammt aus der „BrassicaDB“ des John Innes Center. In der Datenbank www.brassica.info sind die Informationen von 799 öffentlichen *Brassica* SSR-Markern hinterlegt.

1.3. Synthese und Funktion der Tocochromanole

Der Begriff Vitamin E wurde 1922 von Evans und Bishop beschrieben. Bei Versuchen mit Ratten stellten sie fest, dass der Mangel an bestimmten Fetten zur Sterilität führte. Nach der Beigabe von Weizenkeimöl zur Nahrung konnten sich die Tiere wieder vermehren. Die Vitamin E-Funktion vermittelnde Substanz wurde später als α -Tocopherol identifiziert (Evans et al. 1936). Heute ist bekannt, dass sich hinter den Begriffen Tocochromanol bzw. Vitamin E eine Stoffgruppe von acht natürlich

vorkommenden Substanzen verbirgt. Es werden zwei Untergruppen unterschieden, die Tocotrienole, die eine ungesättigte Seitenkette haben und die Tocopherole, deren Seitenkette gesättigt ist (Abbildung 1). Ihnen gemein ist der Aufbau aus einer hydrophilen Kopfgruppe, dem Chromanolring, sowie einer lipophilen Seitenkette. Innerhalb beider Gruppen werden jeweils vier Formen (α -, β -, γ - und δ) unterschieden, die in Position und Anzahl der am Chromanolring substituierten Methylgruppen variieren (Abbildung 1).

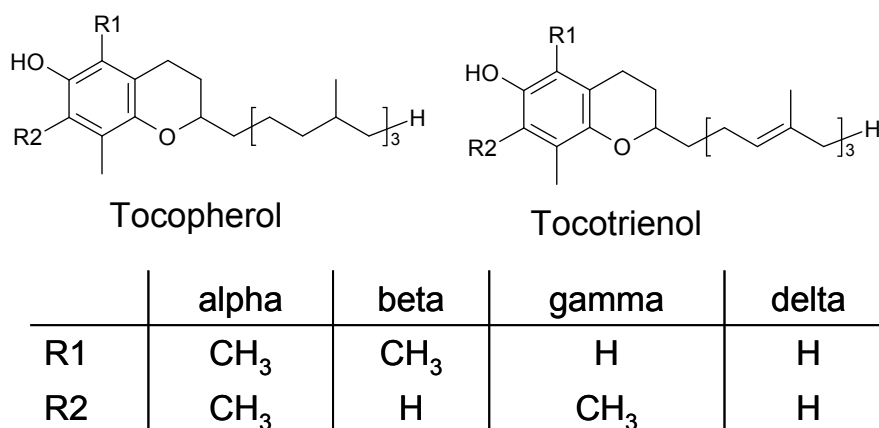


Abbildung 1: Strukturen der Tocopherol- und Tocotrienolverbindungen. Die Übersicht zeigt die unterschiedlichen Substitutionsmuster am Chromanolring für die α -, β -, γ - und δ -Formen.

1.3.1. Die Synthese und Akkumulation von Tocochromanolen in Pflanzen

Tocochromanole werden, soweit bis heute bekannt, ausschließlich von Pflanzen und einigen Cyanobakterienarten synthetisiert. Für die Synthese werden, ausgehend vom p-Hydroxyphenylpyruvat und Prenyldiphosphat bei den Tocopherolen sowie p-Hydroxyphenylpyruvat und Geranylgeranyldiphosphat bei den Tocotrienolen, jeweils fünf Enzyme benötigt. Die Syntheseschritte sind in Abbildung 2 für die Tocopherole dargestellt. Im Cytoplasma erfolgt die Umwandlung von p-Hydroxyphenylpyruvat in Homogentisat durch die Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (HPPD). Alle weiteren Syntheseschritte erfolgen in den Plastiden. Das aus dem Non-Mevalonatweg hervorgehende Prenyldiphosphat wird durch die Prenyltransferase (bzw. bei Tocotrienolen das Geranylgeranyl-Diphosphat durch die HGGT) auf das Homogentisat unter CO₂-Abspaltung übertragen. Die weiteren Schritte laufen in beiden Gruppen der Tocochromanole identisch ab, so dass hier im folgenden nur von den Tocopherolen die Rede sein wird. Das entstandene 2-Methyl-6-phytyl-1,4-benzoquinon (MPBQ) kann methyliert werden, es entsteht 2,4-Dimethyl-6-phytyl-1,4-benzoquinon (DMPBQ). MPBQ und DMPBQ können durch die Tocopherolcyclase zu γ -Tocopherol bzw. β -Tocopherol umgesetzt werden. Eine weitere Methyltransferase (g-TMT) katalysiert die Methylierung dieser beiden Stoffe zu α - bzw. δ -Tocopherol.

In Tabelle 1 ist eine Übersicht der an der Tocopherolsynthese beteiligten Enzyme sowie deren zugehörigen Genloci in *A. thaliana* dargestellt. Die Gene wurden zum einen durch Untersuchungen an Mutantenkollektionen, zum anderen über Homologiesuche zu den

aus *Synechocystis sp.* PCC6803. bekannten Genen identifiziert (Bergmüller et al. 2003, Cheng et al. 2003, Collakova und DellaPenna 2001, Norris et al. 1998, Porfirova et al. 2002, Van Eenennaam et al. 2003). Jedes dieser Gene liegt in einer Kopie im *A. thaliana* Genom vor. Durch Kartierung von QTL (*Quantitative Trait Loci*) konnten Gilliland et al. (2006) zeigen, dass für die Merkmale Tocopherolgehalt und Tocopherol-Zusammensetzung in *A. thaliana* noch weitere als die direkt für die Synthese benötigten Gene verantwortlich sind. Auch Valentin et al. (2006) konnten mit der Identifikation des *VTE5*-Gens zeigen, dass Gene angrenzender bzw. abzweigender Stoffwechselwege Einfluss auf die Tocopherolsynthese nehmen.

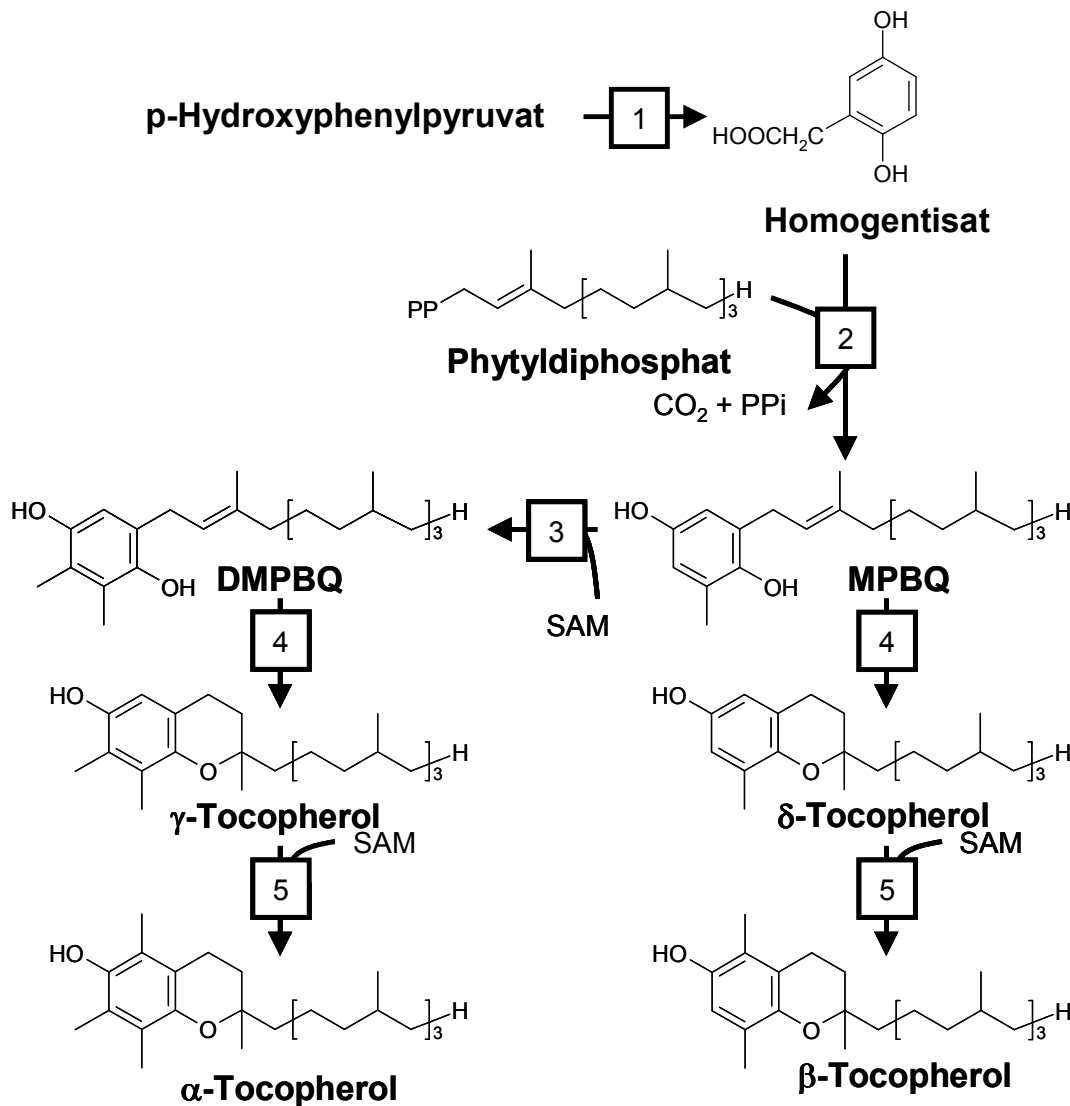


Abbildung 2: Der Tocopherol-Biosyntheseweg der Pflanzen. Die Kästen symbolisieren die beteiligten Enzyme. 1: HPPD-Dioxygenase (HPPD), 2: Homogentisatphytyltransferase (HPT), 3: MPBQ/MSBQ-Methyltransferase, 4: Tocopherolcyclase (TC) und 5: γ -Tocopherolmethyltransferase (g-TMT). DMPBQ: 2,3-Dimethyl-5-phytyl-1,4-benzoquinon, MPBQ: 2-Methyl-6-phytyl-1,4-benzoquinon, SAM: S-adenosylmethionin

Mit Ausnahme der HPPD werden die an der Tocopherolsynthese beteiligten Enzyme mittels Transitpeptid in die Plastiden eingeschleust. Bis heute wurde kein Weg beschrieben, der einen Transport der Tocopherole aus den Plastiden vermuten lässt. Es

wurden zwar in einer früheren Arbeit von Hughes et al. (1971) Tocopherole außerhalb der Plastidenfraktion beschrieben, doch ist es sehr wohl möglich, dass es sich hierbei schlicht um Verunreinigungen handelte. Mit Hilfe neuerer und verbesserter Techniken wird es künftig möglich sein, diese Frage abschließend zu beantworten.

Tabelle 1: Übersicht der an der Tocopherolsynthese direkt beteiligten Enzyme und die hierfür in *A. thaliana* kodierenden Gene.

Enzymname	Abkürzung ¹	Lokalisation des Enzyms	Genname	Bezeichnungen des Genlocus
p-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase	HPPD	Cytoplasma	At1g06590	<i>PDS1</i> ^{2,3} , <i>HPD</i>
Homogentisatprenyltransferase	HPT	Plastiden	At2g18950	<i>HPT1</i> ² , <i>VTE2-1</i> ³ , <i>TPT1</i> , <i>HPT</i> , <i>ATHPT</i>
Tocopherolcyclase	TC	Plastiden	At4g32770	<i>VTE1</i> ^{2,3}
MPBQ/DMPBQ-Methyltransferase	MPBQ/DMPBQ MT	Plastiden	At3g63410	<i>APG1</i> ^{2,3} , <i>VTE3</i>
γ -Tocopherolmethyltransferase	gTMT	Plastiden	At1g64970	<i>G-TMT</i> ² , <i>TMT1</i> , <i>VTE4</i> ³

¹ laut TAIR-Datenbank, ² offizielle Bezeichnung laut TAIR Datenbank, ³ in dieser Arbeit verwendete Bezeichnung

Generell werden Tocochromanole in allen Pflanzenteilen gefunden. Die Zusammensetzung und Menge der Tocochromanole variiert jedoch erheblich zwischen verschiedenen Geweben und verschiedenen Pflanzenarten (Grusak und DellaPenna 1999). In Blättern und Sprossen ist mit durchschnittlich 10 mg/kg bis 50 mg/kg deutlich weniger Tocopherol zu finden als in Samen (DellaPenna 2005). Bei *A. thaliana* liegt der Gehalt im Samen mit 200 mg/kg bis 300 mg/kg circa 10mal höher als im Blatt (Cheng et al. 2003, Gilliland et al. 2006). In den Samen, insbesondere bei ölhaltigen Arten, akkumulieren große Mengen an Tocopherolen. Der Tocopherolgehalt wird hier häufig auf den Ölgehalt bezogen und liegt zwischen 300 ppm und 2000 ppm (DellaPenna 2005). In *A. thaliana* werden nur Tocopherole und keine Tocotrienole gefunden. Letztere sind besonders, aber nicht ausschließlich in Samen von Monokotyledonen nachweisbar und hier im Endosperm und nicht im Embryo (Falk et al. 2004). Durch Integration eines HGGT-kodierenden Gens, sind aber auch natürlicherweise nicht Tocotrienol synthetisierende Pflanzen zu deren Akkumulation fähig (Cahoon et al. 2004). Bei den meisten Pflanzenarten ist in Blättern hauptsächlich die α -Form nachweisbar, während in den Samen überwiegend γ -Tocopherol vorhanden ist (DellaPenna 2005). Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass die einzelnen Tocochromanolspezies in verschiedenen Pflanzen und Pflanzenteilen unterschiedliche Funktionen haben.

1.3.2. Bedeutung der Tocochromanole für die Pflanze

Die genaue Bedeutung der Tocochromanole für die Pflanzen ist bis heute nicht umfassend geklärt. Fest steht, dass die Funktionen vielfältiger sind als zu Beginn der Tocochromanolforschung angenommen wurde. Tocochromanole können aufgrund ihrer Struktur als Antioxidantien wirken (siehe Abbildung 3).

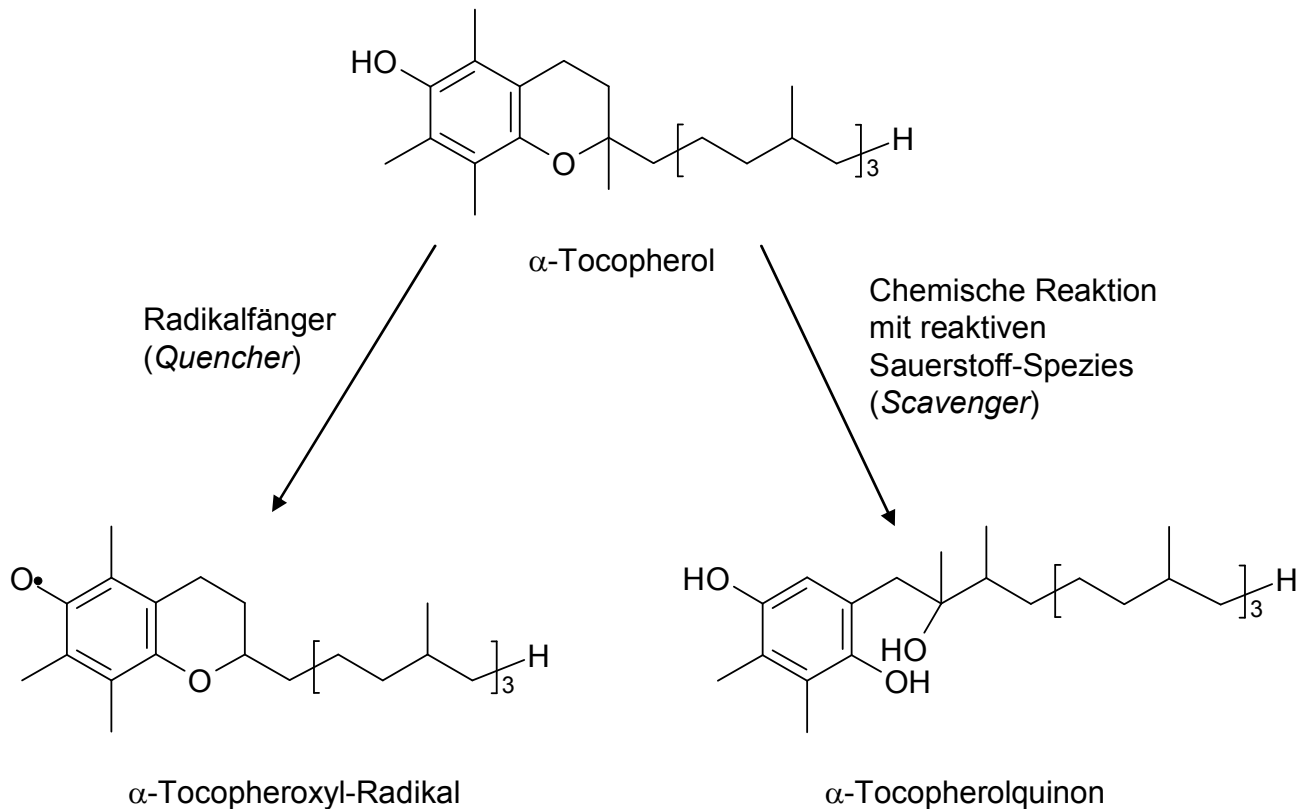


Abbildung 3: Schematische Darstellung von α -Tocopherol als Antioxidans. Die Wirkung erfolgt über zwei Mechanismen. Zum einen kann α -Tocopherol als Radikalfänger (*Quencher*) zur Entgiftung von Fettsäureradikalen wirken, wobei es selbst zum Radikal wird. Zum anderen kann es chemisch mit reaktiven Sauerstoff-Spezies reagieren; es entsteht Tocopherolquinon.

Aufgrund ihrer Lokalisation wurde angenommen, dass sie in den Plastiden, in denen ständig reaktive Sauerstoffspezies entstehen, Schutzfunktionen übernehmen. Einige Studien der letzten Jahre zeigten, dass dieses tatsächlich einen Teil der Tocochromanolfunktion ausmacht. Die Funktion kann bei Tocopherol-Mangelmutanten allerdings von anderen antioxidativ wirksamen Substanzen kompensiert werden (Havaux et al. 2003, Havaux et al. 2005, Miller et al. 2004, Munné-Bosch 2005). Es wird auch diskutiert, dass Tocochromanole, die sich aufgrund ihrer Struktur gut in Membranen einlagern können, regulatorischen Einfluss auf die Membranfluidität ausüben und sich damit auf die Kältetoleranz von Pflanzen auswirken (Munné-Bosch und Alegre 2002). Die hohe Akkumulation in Samen und die zu den Blättern abweichende Tocopherol-Zusammensetzung lassen vermuten, dass Tocochromanole hier besondere Funktionen haben. Früher wurde angenommen, dass die Tocochromanole die Speicheröle vor Oxidation schützen. Angenommen, die Lokalisation der Tocochromanole sei auf Plastiden begrenzt, kann dieser Schutz nur bei

plastidären Ölen direkt erfolgen. Es ist davon auszugehen, dass die verschiedenen Tocochromanole in den unterschiedlichen Pflanzen und Pflanzenteilen abweichende Funktionen haben. Desel et al. (2007) konnten z. B. einen Einfluss des γ -Tocopherol-Anteils auf die Keimung feststellen. Tocopherol-Mangelmutanten von Kartoffel und Mais zeigen abweichend von *A. thaliana* einen gestörten Export von Photoassimilaten (Hofius et al. 2004, Porfirova et al. 2002). Des Weiteren wird die Funktion der Tocochromanole in der Signaltransduktion und in der Wechselwirkung mit Phytohormonen diskutiert (Munné-Bosch 2005). Neben den hier aufgezählten Funktionen gibt es weitere Ansätze, die in verschiedenen Übersichtsarbeiten dargestellt sind (Dörmann 2007, Munné-Bosch und Alegre 2002, Munné-Bosch und Falk 2004).

1.3.3. Bedeutung der Tocochromanole für die menschliche Ernährung

Der Mensch ist auf die externe Zufuhr von Tocochromanolen angewiesen. In der Humanernährung werden sie als Vitamin E bezeichnet. Als fettlösliche Substanzen werden Tocochromanole hauptsächlich durch pflanzliche Öle und ölhaltige Früchte aufgenommen (Tabelle 2).

Tabelle 2: Übersicht der Tocochromanol-Gehalte verschiedener Pflanzenöle und Nüsse (verändert nach Elmadfa et al. 2003).

Quelle	Tocochromanol-Gehalt (mg/kg)
Weizenkeimöl	1850
Sonnenblumenöl	500
Maiskeimöl	311
Rapsöl	300
Sojaöl	290
Haselnüsse	266
Mandeln	252
Erdnüsse	103
Walnüsse	60

Die einzelnen Tocochromanole haben unterschiedliche Vitamin E-Aktivität. Dies liegt zum einen an ihrer unterschiedlichen antioxidativen Wirkung, zum anderen an der selektiven Aufnahme des α -Tocopherols durch das α -Tocopherol-Bindeprotein der Leber (Brigelius-Flohe und Traber 1999). Die von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) empfohlene Tagesdosis wird aufgrund der unterschiedlichen Aktivität der einzelnen Tocochromanole in α -Tocopherol-Äquivalenten angegeben. Abhängig von Alter und Geschlecht liegt die empfohlene Tagesdosis zwischen 12 mg und 15 mg Tocopherol-Äquivalenten. Bei ausgewogener Ernährung treten praktisch keine Mangelerscheinungen auf. Bei Minderversorgung oder gestörter Aufnahme kommt es zunächst zu einer Schwächung des Immunsystems, gefolgt von einer Beeinflussung des gesamten Stoffwechsels. Membranschädigungen, Schädigung des Muskelstoffwechsels

und des Nervensystems können die Folge sein (Brigelius-Flohe und Traber 1999). Eine Metastudie über die Wirkung hoher Vitamin E-Gaben (Miller et al. 2004) zeigte, dass eine übermäßige Versorgung mit synthetischem Vitamin E gesundheitsschädliche Wirkung haben kann. Allgemein wird jedoch darauf hingewiesen, dass sich diese Studie auf Erkenntnisse mit kranken Menschen bezieht und auf gesunde Erwachsene nicht übertragbar ist.

1.3.4. Untersuchungen zur Tocopherolakkumulation in Raps

Thies et al. (1997) etablierten eine Methode zur HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) Analyse des Tocopherolgehaltes in Rapssamen. In den folgenden Jahren wurden auf der Grundlage dieser Methode Untersuchungen zur Tocopherolakkumulation in Rapssamen durchgeführt. Goffman et al. (1999b) verfeinerten die Methode zur Analyse von Einzelsamen. Goffman und Becker (2002) konnten zeigen, dass es genetische Variabilität in der Tocopherolzusammensetzung und im Gehalt gibt. Die Untersuchung von 87 *B. napus* Genotypen ergab eine Variabilität im Tocopherolgehalt im Bereich von 180 mg/kg bis 370 mg/kg im Samen und in dem α -/ γ -Tocopherolverhältnis von 0,36 zu 1,23. Goffman et al. (1999a) konnten zeigen, wie die Tocopherolakkumulation in den Samen im Laufe des Reifeprozesses abläuft. Die Untersuchungen ergaben, dass die größte Akkumulation in der Zeit zwischen dem 41. und dem 53. Tag nach der Blüte erfolgt. Es konnten keine Hinweise auf einen Export aus den Schoten gefunden werden. Ein möglicher Zusammenhang zwischen Chlorophyll-Degradierung und Tocopherolakkumulation wurde bestätigt. Des Weiteren konnte in derselben Arbeitsgruppe nachgewiesen werden, dass intakte Rapssamen, die über einen Zeitraum von 24 Wochen gelagert wurden, keine Veränderungen im Tocopherolgehalt wohl aber in der Tocopherol-Zusammensetzung aufweisen (Goffman und Möllers 2000). Goffman und Becker (1999) und Marwede et al. (2004) konnten zeigen, dass der Tocopherolgehalt und die Zusammensetzung genetisch determiniert sind, die Umwelt jedoch einen hohen Einfluss hat. Die Heritabilität wird von Marwede et al. (2004) mit 0,23 bis 0,5 angegeben. Durch Untersuchung einer Doppelhaploidenpopulation (DH-Population) konnten Marwede et al. (2005) QTL-Positionen für Tocopherolgehalt und -zusammensetzung identifizieren. Hierbei wurden 8 QTL auf 6 Kopplungsgruppen kartiert. Bis heute gibt es keine Beschreibung eines endogenen *B. napus* Tocopherolbiosynthese-Gens mit nachgewiesener Funktion. Kumar et al. (2005) und Raclaru et al. (2006) konnten durch Transformation von Raps mit verschiedenen Tocopherol-Synthesegenen den Tocopherolgehalt erhöhen und die Tocopherol-Zusammensetzung verändern. Es gelang ihnen den Tocopherolgehalt in Samen für einzelne Pflanzen auf das 2 bis 3fache (1000 ppm -1500 ppm) zu erhöhen. Für die menschliche Ernährung wird eine Erhöhung des Tocopherolgehaltes im Rapsöl angestrebt (Lühs et al. 2000). Natürliches Tocopherol kann aus Rapsöl extrahiert werden und wäre damit eine „gentechnikfreie“ Alternative zu dem zumeist aus Soja gewonnenen Tocopherol. Für die Humanernährung hat α -Tocopherol (wie in Kapitel 1.3.3 beschrieben) die größte Bedeutung. Für den Schutz des Öls vor oxidativer

Schädigung sind wiederum γ - und δ -Tocopherol besser geeignet. Daher wird neben der Züchtung auf einen hohen Tocopherolgehalt auch die Züchtung von Rapssorten mit speziellen Tocopherolmustern angestrebt.

1.4. Arbeitshypothesen und Ziele

Die genetische Grundlage der Tocopherolsynthese ist in *A. thaliana* weitestgehend aufgeklärt. Die nahe Verwandtschaft von Arabidopsis zu Raps und die Akkumulation von Tocopherolen im Rapssamen, lassen vermuten, dass orthologe Gene in Raps vorhanden sind.

Da die Gene der Tocopherolsynthese maßgeblich an der Ausprägung der Merkmale Tocopherolgehalt und Tocopherolzusammensetzung beteiligt sind, kann angenommen werden, dass Sequenzvariationen innerhalb der Gene einen Einfluss auf diese Merkmale haben.

In dieser Arbeit wurden, um weitergehende Erkenntnisse über die Synthese der Tocopherole in Raps zu erhalten und um allelische Unterschiede in den Tocopherol-Genen mittelfristig als molekulare Marker zur Selektion von Rapssorten mit erhöhtem Tocopherolgehalt sowie unterschiedlichem Tocopherolmuster nutzbar zu machen, nachstehende Ziele verfolgt:

- Bestimmung des Tocopherolgehalts und der Zusammensetzung in *B. napus*
- Analyse einer für das Merkmal Tocopherolgehalt spaltenden Population
- Klonierung von *B. napus* Sequenzen mit Homologie zu Genen der Tocopherolbiosynthese
- Molekulare Charakterisierung der *B. napus* Sequenzen
- Funktionelle Untersuchung der *B. napus* Sequenzen
- Vergleichende Kartierung von Tocopherol-Genen mit Tocopherol-QTL
- Assoziation von Haplotypen mit dem Tocopherolgehalt

Zum Erreichen dieser Ziele stand Saatgut von 76 Rapsherkünften zur Verfügung, die auf ihren Tocopherolgehalt untersucht werden und aus denen mögliche Eltern für eine spaltende Population identifiziert werden sollten. Mit *Brassica*-ESTs und der Geninformation aus *A. thaliana* sollten zu den Genen der Tocopherolbiosynthese homologe *B. napus* Sequenzen identifiziert werden. Die Identifikation der Vollängensequenzen sollte mittels RACE (*Rapid amplification of cDNA ends*) und durch Vergleich mit dem entsprechenden Arabidopsis Gen erreicht werden. Die funktionelle Überprüfung der *B. napus* Sequenzen sollte durch Überexpressions- oder

Komplementationsstudien in *A. thaliana* erfolgen. Zur Kartierung der *B. napus* Sequenzen stand eine Kartierungspopulationen zur Verfügung.

Diese Arbeit war Teil des 2002 in Kiel initiierten Graduiertenkollegs 820 „Natürliche Antioxidantien - ihr Wirkungsspektrum in Pflanzen, Lebensmitteln, Tier und Menschen.“

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien, DNA-Mengen- und Größenstandards, Enzyme und Kits

Tabelle 3: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien

Produkt	Hersteller
α [³² P]-dATP	GE Healthcare, München
α [³² P]-dCTP	GE Healthcare, München
(N-morpholino)ethansulfonsäure	Duchefa, Haarlem, Niederlande
2-Isopentenlyadenin	Duchefa, Haarlem, Niederlande
Adenosintriphosphat (ATP)	Roth, Karlsruhe
Agarose Seakem®LE	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ampicillin Natriumsalz	Duchefa, Haarlem, Niederlande
Bacto Agar	Applichem, Darmstadt
Bacto Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Bacto Trypton	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Applichem, Darmstadt
Bromphenolblau	Boehringer, Ingelheim
Carbenicillin di-Natriumsalz	Duchefa, Haarlem, Niederlande
Cefotaxim Natriumsalz	Duchefa, Haarlem, Niederlande
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Serva, Heidelberg
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Chloroform/Isoamylalkohol	Serva, Heidelberg
Daichin Agar	Duchefa, Haarlem, Niederlande
dGTP	Fermentas, St. Leon-Rot
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
di-Natriumhydrogensulfat	Roth, Karlsruhe
dNTP-Mix	Fermentas, St. Leon-Rot

dTTP	Fermentas, St. Leon-Rot
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol p. a.	Roth, Karlsruhe
Ethanol, vergällt	BfB, Frankfurt a.M.
Ethidiumbromid (1 % w/v in H ₂ O)	Serva, Heidelberg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Appllichem, Darmstadt
Formaldehyd 37 %	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Gamborgs B ₅ Elemente und Vitamine	Duchefa, Haarlem, Niederlande
Glukose	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Heringsperma	Serva, Heidelberg
Indol-3-Buttersäure (IBA)	Duchefa, Haarlem, Niederlande
Indol-3-Essigsäure (IAA)	Duchefa, Haarlem, Niederlande
IPTG	Roth, Karlsruhe
Isopropanol p. a.	Roth, Karlsruhe
Kanamycin Monosulfat	Duchefa, Haarlem, Niederlande
Kinetin	Duchefa, Haarlem, Niederlande
Magnesiumchlorid	Invitrogen, Karlsruhe
MOPS	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Appllichem, Darmstadt
Natrium-Dodecylsulfat (SDS), p. a.	Appllichem, Darmstadt
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriumhypochlorid	Roth, Karlsruhe
n-Heptan für die HPLC	LGC Promochem, Wesel
Oligo(dNTP) ₆ -Primer	Fermentas, St. Leon-Rot

Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Biomol, Hamburg
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	Sigma, München
Rifampicin	Duchefa, Haarlem, Niederlande
Rinder Serumalbumin (BSA)	Sigma, München
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Sephadex G50	GE Healthcare, München
Tocopherolstandardsubstanzen	Merck, Darmstadt
tri-Natrium-Citrat	Roth, Karlsruhe
Tris	Biomol Feinchem. GmbH, Hamburg
Triton-100	Roth, Karlsruhe
Trizol®	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Vancomycin HCl	Duchefa, Haarlem, Niederlande
X-Gal	Roth, Karlsruhe
X-Gluc	Duchefa, Haarlem, Niederlande
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe

Tabelle 4: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten *Kits*

Kit	Hersteller
BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit	BD Biosciences, Heidelberg
NucleoSpin® Extract II	Macherey & Nagel, Düren
NucleoSpin® Plasmid Quick Pure	Macherey & Nagel, Düren
NucleoSpin® 96 Plant	Macherey & Nagel, Düren

Tabelle 5: Übersicht der in dieser Arbeit zur Abschätzung von DNA-Fragmenten verwendeten Längen- und Mengenstandards

Standard	Hersteller
1kB-Leiter	Fermentas, St. Leon-Rot
λ -DNA	Fermentas, St. Leon-Rot

Tabelle 6: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme

Enzym	Hersteller
Klenow-Fragment	GE Healthcare, München
Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
T4-Ligase	Promega, Madison, USA
alkalische Phosphatase (SAP)	GE Healthcare, München
<i>KpnI</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>EcoRI</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>EcoRV</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>XhoI</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>XbaI</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>HindIII</i>	Fermentas, St. Leon-Rot

2.2. DNA-Klone, Sonden und Oligonukleotide

Tabelle 7: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Sonden für die Southern-Hybridisierung

Sonde	Größe [bp]	Bemerkung
BnAPG1	1243	Amplifiziert aus Klon 3504 mit Primerkombination apg 1fw / apg 1rv
BnPDS1-750	773	Amplifiziert aus Klon 3503 mit Primerkombination pds 1fw / pds 1rv
BnVTE4-1000	1063	Amplifiziert aus Klon 3486 mit Primerkombination vte4 1fw / vte4 1rv

Tabelle 8: Übersicht der erstellten und verwendeten DNA-Klone und der sequenzierten PCR-Produkte

Klon Nr.	Vektor	Fragment	Größe des Fragments (bp)	Herkunft
3482 ¹	pet15b	<i>PDS1</i>	1500	<i>A. thaliana</i>
3483	PCR-Produkt	BnPDS1-750	773	<i>B. napus</i>
3484	PCR-Produkt	BnPDS1-1500	1555	<i>B. napus</i>
3485 ¹	pBluescriptII	<i>VTE4</i>	1700	<i>A. thaliana</i>
3486	pGEM®T	BnVTE4-1000	1063	<i>B. napus</i>
3487	pGEM®T	BnVTE4-1000	1063	<i>B. napus</i>
3488	pGEM®T	BnVTE4-750a	737	<i>B. napus</i>
3489	pGEM®T	BnVTE4-750b	741	<i>B. napus</i>
3490	pGEM®T	BnVTE4-750c	735	<i>B. napus</i>
3491	pGEM®T	vte4 5'RACE	548	<i>B. napus</i>
3492	pGEM®T	vte4 5'RACE	337	<i>B. napus</i>
3493	pGEM®T	vte4 5'RACE	164	<i>B. napus</i>
3494	pGEM®T	vte4 5'RACE	156	<i>B. napus</i>
3495	pGEM®T	vte4 3'RACE	680	<i>B. napus</i>
3496	pGEM®T	BnVTE4-1	1160	<i>B. napus</i>
3497	pGEM®T	BnVTE4-2	1163	<i>B. napus</i>
3498	pGEM®T	BnVTE4-3	1160	<i>B. napus</i>
3499	pGEM®T	BnVTE4-4	1149	<i>B. napus</i>
3500	pAM194	BnVTE4-1	1160	<i>B. napus</i>
3501	PCR-Produkt	BnAPG1	1243	<i>B. napus</i>
3502	pAM194	BnAPG1	1243	<i>B. napus</i>
3503	pGEM®T	BnPDS1-750	773	<i>B. napus</i>
3504	pGEM®T	BnAPG1	1243	<i>B. napus</i>
3506	PCR-Produkt	BnAPG1-Mansholt	1243	<i>B. napus</i>
3507	PCR-Produkt	BnAPG1-Samurai	1243	<i>B. napus</i>

¹ Plasmide wurden von Dr. Jon Falk (Botanisches Institut, CAU Kiel) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide (Primer). Die Synthese erfolgte durch die Firma MWG-Biotech GmbH (Ebersberg).

Primername	Primersequenz	Verwendung/ Bezeichnung des Amplifikats	Annealing- Temperatur
vte4 1fw	5'AGAGAGCCAATGATCTCG	<i>BnVTE4</i> -1000	51 °C
vte4 1rv	5'CCCTTCAATCATCAATGG		
vte4 2fw	5'TTATGGGAGGAGATTTGG	<i>BnVTE4</i> -750	57 °C
vte4 2rv	5'GCGAGATCATTGGCTCTCT		
vte4 3fw	5'TTTCTCCAACCAACCTCTCATTATAA	<i>BnVTE4</i>	50 °C
vte4 3rv	5'ACGACAATTTTATTG		
vte4 Xhofw	5'TTTCTCGAGCCAACCTCTCATTATAA	Integration von <i>Xho</i> I-Schnittstellen in <i>BnVTE4</i>	50 °C
vte4 Xhorv	5'CTCGAGTTCAATCTCC		
pds 1fw	5'TCACTGCTCCTTACTCTCC	<i>BnPDS1</i> -750	52 °C
pds 1rv	5'CACACTCCTTGATCTGATC		
pds 2fw	5'ATACATTGTTATACTGAGCC	<i>BnPDS1</i> -1500	50 °C
pds 2rv	5'ATCTTAAGACTGTATACACC		
apg 1fw ¹	5'ACTACCCGATCTGATAAGC	<i>BnAPGI</i>	51 °C
apg 2rv ¹	5'GGTATTACAAATCATAAGTTG		
apg Ecofw	5'GAATTCACCTACCCGATCTGATAAGC	Integration von <i>Eco</i> RI-Schnittstellen in <i>BnAPGI</i>	51 °C
apg Ecorv	5'GAATTCGGTATTACAAATCATAAGTTG		
35S fw	5'CAATCCCCTATCCTT	Überprüfung der Konstrukte	--
SP6	5'CATTTAGGTGACACTATAG	Sequenzierprimer	--
T7	5'TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierprimer	--
M13 fw	5'TGTAAAACGACGGCCAGT	Sequenzierprimer	--
M13 rv	5'CAGGAAACAGCTATGACC	Sequenzierprimer	--

¹ Sequenzinformation wurde von Prof. J. Meng (National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan, China) zur Verfügung gestellt.

2.3. Bakterienstämme

Tabelle 10: Übersicht der zur Klonierung und Transformation verwendeten Bakterienstämme

Bezeichnung	Hersteller/Referenz
<i>E. coli</i> NEB 5-alpha Competent	New England Biolabs
<i>E. coli</i> One Shot® TOP10 competent cells	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Stamm GV3101	Koncz und Schell (1986)

2.4. Pflanzenmaterial

Folgendes Material wurde zur Durchführung der verschiedenen Experimente verwendet:

Raps (*Brassica napus*):

Die Sorte „Express“ (Saatgut Nr. 070443) wurde von der NPZ (Norddeutsche Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG, Holtsee, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Aus den Blättern dieser Rapsorte wurde zum Einsatz in den verschiedenen PCR und Hybridisierungsexperimenten DNA isoliert. Blätter, Samen und Schoten wurden zur Extraktion von RNA verwendet. Weiterhin stand Saatgut von 76 Herkünften aus Zuchtmaterial der NPZ zur Tocopherolanalytik zur Verfügung. Information zu diesem Material ist dem Anhang (Tabelle 24) zu entnehmen.

Zur Kartierung wurde die Doppel-Haploiden Population (DH) aus der Kreuzung „Mansholt’s Hamburger Raps“ x „Samourai“ verwendet. Das Saatgut der Kartierungseltern sowie von 79 DH-Linien wurde von Dr. Wolfgang Ecke (Abteilung Pflanzenzüchtung, Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt. Einzelheiten sind in Tabelle 25 im Anhang dargestellt.

Arabidopsis thaliana:

Für die Transformation und zur Extraktion von DNA wurde der *A. thaliana* Ökotyp Columbia verwendet. Das Saatgut wurde von Dr. Jon Falk (Botanisches Institut, CAU Kiel) gestellt.

2.5. Molekulare Standardmethoden

2.5.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (Mullis et al. 1986) können definierte Nukleinsäuresequenzen *in vitro* enzymatisch amplifiziert werden. Für diese Arbeit wurden als Matrize genomische DNA, Plasmid-DNA, Erststrang cDNA und Teile von

in H₂O resuspendierten Bakterienkolonien (Kolonie-PCR) verwendet. Die Reaktionen fanden in dem Thermocycler T-Gradient 96 (Biometra, Göttingen) statt. Als Enzym wurde die *Taq*-DNA-Polymerase von der Firma Invitrogen verwendet. Ein PCR-Ansatz enthielt neben 1 ng bis 50 ng Matrizen-DNA 0,2 mM dNTP-Mix, 1 µM der beiden einzusetzenden Primer, 1x *Taq*-Puffer, 1,5 mM MgCl₂ und 2 Units *Taq*-DNA-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe). Einer anfänglichen Denaturierung der DNA für 5 Minuten bei 94 °C folgten 32 Amplifizierungszyklen. Ein Zyklus bestand aus einer Denaturierung für eine Minute bei 94 °C, einer Minute Primer-*annealing* und einer einminütigen Elongation bei 72 °C. Die *annealing*-Temperatur wurde den jeweiligen Primerkombinationen angepasst. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 9 aufgelistet.

2.5.2. DNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA erfolgte durch eine Gelelektrophorese in 1 x TAE-Puffer. Der Gellösung wurden 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hinzugefügt, um die aufgetrennte DNA durch UV-Bestrahlung (306 nm) sichtbar zu machen. Die DNA-Lösung wurde vor dem Auftragen mit 1/10 Volumen 10 x Beladungspuffer versetzt. Als Längenstandard wurde eine 1 kbp-DNA-Leiter (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet.

10 x TAE-Puffer		10 x Beladungspuffer	
Tris-Acetat	40 mM	Bromphenolblau	0,1 % (v/v)
EDTA	2 mM	Glycerin	50 % (v/v)
Essigsäure	20 mM	TAE-Puffer	1 x
pH 7,5		pH 7,5	

2.5.3. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgte als Auftragsarbeit am Universitätsklinikum SH, Institut für klinische Molekularbiologie. Hierfür wurden die zu sequenzierenden PCR-Produkte in einem Volumen von 12 µl und die zum Sequenzieren verwendeten Primer mit einer Konzentration von 1,6 pmol/µl vorbereitet. Die Sequenzierung erfolgte mit dem ABI 3730 96-Kapillarsequenzierer (Applied Biosystems, Foster City, USA). Die Sequenzierungsergebnisse wurden als ab1-Dateien zur Verfügung gestellt und mit Programmen der DNASTAR Lasergene Software (GATC-Biotech, Konstanz) weiter bearbeitet.

2.5.4. Isolation genomischer DNA aus pflanzlichem Gewebe

Zur Isolation genomischer DNA wurde eine modifizierte Form der CTAB-Methode (Saghai-Maroo et al. 1984) verwendet. Hierzu wurde das Blattmaterial in flüssigem

Stickstoff schockgefroren und mit Hilfe eines Mörsers oder in einer Schwingmühle (MM2, Retsch, Haan) zu feinem Pulver zermahlen. Nach Zugabe von 1,5 x CTAB-Isolationspuffer wurden die Proben bei 65 °C für 20 Minuten inkubiert. Eine Proteinfällung erfolgte durch Beimengen von 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1). Nach einer 10-minütigen Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und die DNA mit 1 Volumen Isopropanol gefällt. Nach einer kurzen Sedimentation mit 3200 x g bei 4 °C wurde das DNA-Sediment nacheinander mit Waschlösung I und II gewaschen, kurz getrocknet und in H₂O gelöst.

Waschlösung I

Na-Acetat	200 mM
Ethanol	76 % (v/v)

Waschlösung II

Ammoniumacetat	10 mM
Ethanol	76 % (v/v)

CTAB-Isolationspuffer

Tris/HCl pH 7,5	120 mM
EDTA pH 8,0	12 mM
NaCl	800 mM
CTAB	1,2 % (w/v)
2-Mercaptoethanol*	1,2 % (v/v)

*Zugabe direkt vor Gebrauch

Die DNA-Extraktionen aus Blättern vier Wochen alter Pflanzen der Kartierungspopulation (siehe Kapitel 2.4) wurde mit dem *Kit* NucleoSpin® 96 Plant (Machery & Nagel, Düren) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.5.5. Plasmidklonierung

Für die Klonierung von PCR-Produkten wurde der pGEM® T-Vektor der Firma Promega (Madison, USA) verwendet. Dieser Vektor bietet den Vorteil, PCR-Fragmente mit ihrem endständigen Adenin zuverlässig zu integrieren. Eine Farbselektion der transformierten Bakterien war durch das *lacZ*-Gen möglich. Die Klonierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Für die *A. thaliana*-Transformation wurden die zu integrierenden Sequenzen mittels PCR und modifizierten Primern (vergl. Tabelle 9) mit Erkennungssequenzen für ein Restriktionsenzym versehen. Nach einem Restriktionsverdau der zu integrierenden Sequenz und des binären Vektors pAM194 (Kifle et al. 1999) und der Dephosphorylierung des Vektors mit SAP (*Shrimp alkaline phosphatase*) folgte die Ligation mit T4-Ligase (Promega, Madison, USA).

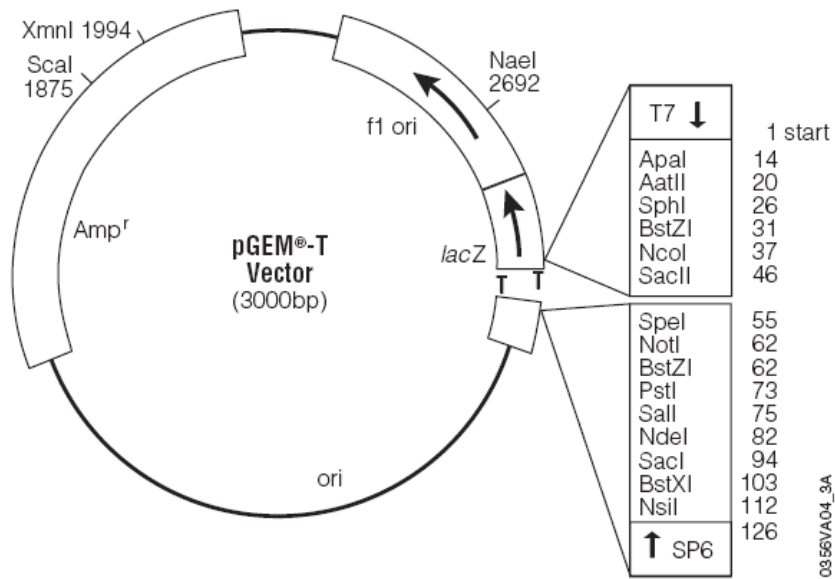


Abbildung 4: Der Klonierungsvektor pGEM®T

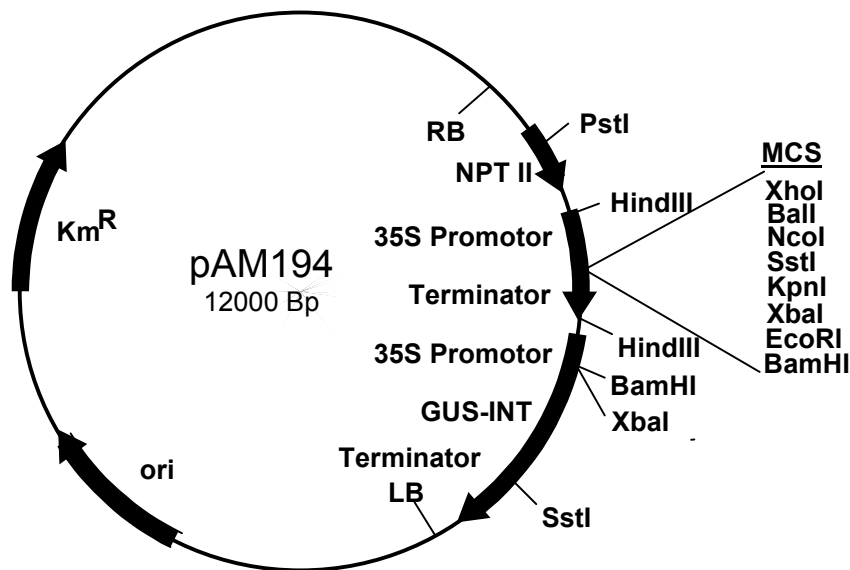


Abbildung 5: Der binäre Vektor pAM194

2.5.6. Hitzeschock-Transformation von *E. coli*

Plasmide wurden nach Herstellerangaben in One Shot® TOP10 Zellen (Invitrogen) oder NEB 5-Zellen (New England Biolabs) durch einen 30 s – 90 s dauernden Hitzeschock (42 °C) transformiert. Nach der Transformation wurden die Bakterien auf selektivem LB-Medium ausgestrichen und über Nacht im Inkubator bei 37 °C angezogen.

2.5.7. Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolation erfolgte aus Übernachtskulturen in 4 ml LB-Medium. Zur Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das NucleoSpin® Plasmid Quick Pure Kit (Machery & Nagel, Düren) nach Vorgabe des Herstellers verwendet. Plasmide wurden in 20 µl – 50 µl H₂O rückgelöst.

LB-Medium

NaCl	1 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
Trypton	1 % (w/v)

2.5.8. Southern-Analyse

Für die Southern-Analyse wurde restringierte genomische DNA in einem 0,75 %igen Agarosegel mit 2 V/cm aufgetrennt und anschließend mit Transfer-Puffer über Nacht auf eine Hybond®-Nylonmembran (GE Healthcare, München) transferiert. Durch ein 20-minütiges Backen bei 80 °C wurde die DNA kovalent an die Membran gebunden. Die freien Bindungsstellen auf der Membran wurden durch eine Vorhybridisierung mit Heringsperma-DNA abgesättigt, um das Hintergrundsignal zu minimieren. Die Markierung der Sonden-DNA erfolgte nach der Methode des *random priming* (Feinberg und Vogelstein 1983), das auf dem Einbau radioaktiv markierter Nukleotide bei der Synthese eines Zweitstranges an einer denaturierten DNA-Matrize beruht. Für die Markierungsreaktion wurden 50 ng DNA eingesetzt, die auf ein Endvolumen von 70 µl verdünnt wurden. Die Sonde wurde 5 Minuten denaturiert und in den Markierungsansatz pipettiert. Die Membranen wurden über Nacht bei 60 °C im Rollinkubator hybridisiert und anschließend bei 60 °C zweifach gewaschen (1 x SSC; 0,2 % SDS) und mit einem Röntgenfilm (Hyperfilm MP, GE Healthcare, München) für 36 Stunden oder Imagingplatten (GE Healthcare, München) für 24 Stunden belegt.

20 x SSPE

Na ₂ HPO ₄	200 mM
NaCl	3 M
EDTA	20 mM
100 x Denhardt	
PVP	2 % (w/v)
BSA, Fraktion V	2 % (w/v)
Ficoll 400	2 % (w/v)

Waschlösung

SSC	1 x
SDS	0,2 %
GT-Mix	
dGTP	0,5 mM
dTTP	0,5 mM

Hybridisierungslösung		Markierungsansatz	
Denhardt	5 x	oligo(dNTP) ₆ (50 u/ml)	10 µl
SSPE	5 x	10 x Klenow-Puffer	10 µl
SDS	0,2 %	GT-Mix	5 µl
Heringsperma-DNA	0,02 % (w/v)	α[³² P]-dCTP	1,5 µl
		α[³² P]-dATP	1,5 µl
20 x SSC		Transfer-Puffer	
Na ₃ -Citrat	0,3 M	NaOH	0,5 M
NaCl	3,0 M	NaCl	1,5 M

2.5.9. Isolation von Gesamt-RNA

RNA von *B. napus* wurde aus Blättern von vier Wochen alten Pflanzen, aus Samen und Schotenwänden unter Verwendung des TRIZOL®-Reagenz (Invitrogen) nach Herstellerangaben isoliert. Hierzu wurden jeweils circa 0,2 g des in flüssigem Stickstoff zerkleinerten Pflanzenmaterials eingesetzt. Die RNA wurde bis zur Verwendung in Ethanol gefällt bei -20 °C gelagert. Zum Einsatz in der RACE-Reaktion (Kapitel 2.6) und zur Erststrangsynthese (Kapitel 2.5.11) erfolgte die Lösung in DEPC-behandeltem H₂O.

2.5.10. RNA-Gelelektrophorese

Die RNA-Qualität wurde im Gel überprüft. Die Auftrennung der RNA erfolgte in einem 1,3 %igen Agarosegel. Als Puffer wurde 1 x MOPS-Puffer verwendet. Die RNA wurde vor dem Auftragen auf das Gel mit 2 Volumen Beladungspuffer versetzt und 10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Die RNA wurde bei einer Feldstärke von 5 V/cm 70 Minuten aufgetrennt.

10 x MOPS-Puffer		Beladungspuffer	
MOPS	20 mM	MOPS-Puffer	1 x
Natriumacetat	5 mM	Formaldehyd (37 %)	17,5 % (v/v)
EDTA	1 mM	Formamid	50,0 % (v/v)
pH 7,0		H ₂ O	22,5 % (v/v)

2.5.11. Synthese von cDNA über RT-PCR

Die Überprüfung der Expression und die Analyse der cDNA Sequenzen erfolgte über RT-PCR. Die Erststrangsynthese wurde mit 0,9 µg bis 1,5 µg Raps-RNA (Kapitel 2.5.9) mittels oligo(dT)-Primern und dem SuperScript™ First-Strand Synthesis-System (Invitrogen) durchgeführt. Die anschließende PCR-Reaktion erfolgte wie unter Kapitel 2.5.1 beschrieben.

2.6. RACE-Methode

Die RACE-Methode (*rapid amplification of cDNA-ends*) dient der Verlängerung einer in Teilen bekannten cDNA-Sequenz. Sie beruht auf der Isolation von RNA und einer anschließenden Übersetzung der RNA in cDNA unter Anlagerung eines Adapters bekannter Sequenz (Siebert et al. 1995). Es folgt eine PCR unter Verwendung eines Primers mit spezifischer Bindungsstelle in der Adaptersequenz und eines internen genspezifischen Primers für die zu verlängernde Sequenz. Dieses Verfahren wurde mittels BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (BD Biosciences, Heidelberg) nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung von 0,9 µg gesamt RNA durchgeführt. Die RACE-Reaktion erfolgte für 25 Zyklen mit 68 °C und für 10 Zyklen mit 67 °C. Die nach der Amplifizierung entstandenen Fragmente wurden direkt aus dem Ansatz in den pGEM® T-Vektor kloniert (siehe Kapitel 2.5.5) und anschließend sequenziert.

2.7. Entwicklung von CAPS (Cleaved amplified polymorphic sequences) Markern

Die CAPS-Methode beruht auf der Amplifizierung eines definierten DNA-Fragments mit anschließendem Restriktionsverdau. Polymorphismen werden durch Unterschiede im Restriktionsmuster (Anwesenheit/Abwesenheit von Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen) detektiert (Konieczny und Ausubel 1993).

Zur Entwicklung des *apg1*-Markers wurden die Sequenzen von *BnAPG1*-Fragmenten der Kartierungseltern „Mansholt's Hamburger Raps“ und „Samourai“ verglichen und unterschiedliche Restriktionsmuster mit dem MapDraw Programm der DNASTAR Lasergene Software (GATC Biotech) identifiziert. Diese Unterschiede wurden genutzt, um die *BnAPG1*-Fragmente der Kartierungseltern sowie der DH-Linien mit *KpnI* zu restringieren und die Fragmente im Agarosegel zu separieren. Das unterschiedliche Restriktionsmuster diente der Zuordnung der DH-Linien zu einem der Elterntypen.

2.8. Verwendete Software

Die Sequenzanalyse wurde mit Hilfe der Software DNASTAR Lasergene (GATC-Biotech) durchgeführt. DNASTAR besteht aus den Programmen MegAlign, EditSeq, SeqMan und MiniMap. Die Programme wurden zur Analyse und zur elektronischen Archivierung von Sequenzdaten und zur Übersetzung der DNA-Sequenz in eine Aminosäuresequenz verwendet. Die Datenbankanalyse erfolgte mit dem WU-BLAST-Algorithmus. Zur Erstellung von Sequenzvergleichen und zur Darstellung von Genstrukturen wurden die Programme AlignX und Vector NTI der Vector NTI Software (Invitrogen) verwendet. Aminosäuresequenzen wurden mittels conserved domain Datenbank (CDD, <http://130.14.29.110/Structure/cdd/cdd.shtml>) oder pfam Datenbank (www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/, Sanger-Institute) auf konservierte Domänen und über TargetP1.1 (www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/ Emanuelsson et al. 2000) auf Importsequenzen untersucht.

2.9. *Agrobacterium tumefaciens* vermittelter Gentransfer in *A. thaliana*

DNA-Sequenzen, die über *A. tumefaciens* vermittelten Gentransfer in *A. thaliana* transformiert werden sollten, wurden in den Vektor pAM194 (Kapitel 2.5.5) ligiert. Zur Überprüfung des Konstrukts wurde dieses zunächst in *E. coli* transformiert. Die korrekte Insertion der DNA-Sequenz im Vektor wurde über eine PCR-Reaktion geprüft. Hierzu wurde ein für den 35S-Promotor spezifischer Primer in Kombination mit einem genspezifischen Primer verwendet. Das entstandene PCR Produkt wurde sequenziert. Auf diese Weise als geeignet identifizierte Plasmide wurden zur *A. tumefaciens*-Transformation verwendet.

Die zur Elektroporation vorgesehenen *A. tumefaciens* Bakterienkulturen wurden in einer 3 ml-Vorkultur angeimpft und über Nacht im Schüttelinkubator angezogen. Die Bakterien wurden dann in eine 30 ml-Kultur überimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,5 (600 nm) angezogen und anschließend bei 1500 x g und 4 °C sedimentiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 10 % Glycerin vorsichtig auf Eis rückgelöst. Dieser Waschschritt wurde zweimal wiederholt. Die Bakterien wurden dann in 3 ml 10 %igem Glycerin gelöst und nach dem Schockgefrieren bei -196 °C in flüssigem Stickstoff bei -72 °C gelagert. Für die Transformation wurden 200 µl dieser Bakteriensuspension mit der zu transformierenden Plasmid-DNA vermischt und in Küvetten mit einem Elektrodenabstand von 2 mm in einem BioRad® Gene Pulser II bei 2,5 kV, 25 µF und 200 Ω elektroporiert. Die so transformierten Bakterien wurden mit 300 µl gekühltem LB-medium vermischt und 2 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Bakterien auf selektivem LB-Medium ausgestrichen und für 1 bis 2 Tage im Inkubator bei 28 °C angezogen.

Rekombinante *A. tumefaciens* Kolonien wurde über Nacht bei 28 °C in 5 ml selektivem YT-Medium angezogen und für eine weitere Nacht in 50 ml YT-Medium kultiviert. Für die Transformation von *A. thaliana* Wurzelexplantaten wurde ein modifiziertes Protokoll der von Valvekens et al. (1988) beschriebenen Methode verwendet. Alle

Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte bei 16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkelheit und 22 °C. Die Sterilisation der Samen erfolgte für 90 Sekunden in 70 % Ethanol und für 10 Minuten in 7 %iger Natrium-Hypochloridlösung. Die Samen wurden dreimal in sterilem Wasser gewaschen und anschließend für zehn Tage in flüssigem B5-Medium unter Schütteln gekeimt. Die Wurzeln wurden vom Rest der Keimlinge getrennt und in circa 5 mm lange Stücke geschnitten. Diese Wurzelexplantate wurden auf eine Nylonmembran (100 Mikron, Hydro-Bios) transferiert und auf Kallusinduktions-Medium (CIM) ausgelegt. Nach zwei Tagen wurden die Nylonmembranen mit den Explantaten für 10 Minuten mit der *A. tumefaciens* Suspension inkubiert, überschüssige Suspension mit Whatman-Papier abgesaugt und auf CIM für zwei Tage kokultiviert. Nach Waschen mit B5-Medium wurden die Membranen auf selektives Sprossinduktions-Medium (SIM) gebracht. Sich entwickelnde Sprosse wurden auf selektives Sprosselongations-Medium und nach Elongation auf Wurzelinduktions-Medium (RIM) transferiert. Bewurzelte Pflanzen wurden unter Verwendung des ARACON Systems (Lehle Seeds, Round Rock, USA) in Erde gepflanzt. Die Primärtransformanten wurden als T0-Generation, die darauf geernteten Samen als T1-Familien bezeichnet.

Um die Integration des Konstrukts in das Genom der regenerierten Sprosse zu überprüfen, wurde ein GUS-Test durchgeführt. Zur Herstellung der GUS-Lösung wurden in 100 ml Lösung AB (38 ml Puffer A + 62 ml Puffer B) 300 µl X-Gluc-Lösung und 1 Tropfen Triton 100 gegeben. Abhängig von der Probengröße wurden 0,2 ml – 1 ml mit der Pflanzenprobe (junges Blatt oder Seitenspross) über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit 70 % EtOH einige Stunden gewaschen, um das Chlorophyll zu entfernen. Das *Gus*-Gen exprimierende Pflanzen zeigten eine dunkelblaue Färbung.

B5-Medium		Sprossinduktions-Medium	
Gamborg B5 Micro and Macro Elemente	3,18 g/l	2ip	5 mg/l
Gamborg B5 Vitamine	0,112 g/l	IAA	0,15 mg/l
Glukose	2 % (w/v)	Carbenicillin	500 mg/l
2-(N-morpholino)-ethanesulfonsäure	0,5 g/l	Vancomycin	100 mg/l
pH 5,7		Kanamycin	50 mg/l
		Daichin Agar	1 % (w/v)
		add. 1 l B5-Medium	
		pH 5,7	

Kallusinduktions-Medium

2,4-D	0,5 mg/l
Kinetin	0,05 mg/l
Daichin Agar	1 % (w/v)

add. 1 l B5-Medium

pH 5,7

Puffer ANaH₂PO₄ x H₂O 200 mM

pH 7

Puffer BNa₂HPO₄ x 12 H₂O 200 mM

pH 7

Sprosselongations-Medium

Vancomycin	50 mg/l
Kanamycin	25 mg/l
Cefotaxim	100 mg/l
Daichin Agar	1 % (w/v)

add. 1 l B5-Medium

pH 5,7

X-Gluc-Lösung

X-Gluc 0,03 g

DMSO 300 µl

Wurzelinduktions-Medium

IBA	0,5 mg/l
Vancomycin	50 mg/l
Kanamycin	25 mg/l
Cefotaxim	100 mg/l
Daichin Agar	1 % (w/v)

add. 1 l B5-Medium

pH 5,7

2.10. HPLC-Methode zur Bestimmung des Tocopherol-Gehaltes

Die Analyse des Tocopherol-Gehaltes mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) erfolgte nach der bei Dähnhardt et al. (2002), Falk et al. (2003) und Schledz et al. (2001) beschriebenen Methode. Reife Samen wurden in 2 ml-Reaktionsgefäßen mit n-Heptan und Glas- und Metallkügelchen (0,2 mm – 5 mm) im Geno/Grinder 2000

(SPEX SamplePrep, Metuchen, USA) aufgeschlossen und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 12 Stunden extrahiert. Für die Analyse wurden 30 mg bis 80 mg Rapssamen eingesetzt und mit $1000\text{ }\mu\text{l}$ n-Heptan extrahiert. Für die Analyse der *A. thaliana* Samen wurden 3 mg bis 15 mg in $90\text{ }\mu\text{l}$ bis $200\text{ }\mu\text{l}$ n-Heptan extrahiert. Die HPLC-Anlage besteht aus einer Pumpe (LC-10ATVP Liquid Chromatograph, Shimadzu, Duisburg), einem Probenaufgabesystem (SIL-10ADVP Autosampler, Shimadzu, Duisburg) sowie einem Fluoreszenzdetektor (RF-10XLFluorescence Detector, Shimadzu, Duisburg). Zur Datenverarbeitung wurde die „ClassVP 5.0“ Software von Shimadzu (Duisburg) verwendet (Beispiel-Chromatogramm siehe Abbildung 6). Das Injektionsvolumen betrug $20\text{ }\mu\text{l}$. Zur Trennung der Tocopherole wurde eine analytische Kieselgelsäule ($5\text{ }\mu\text{m}$ LiChrospher® Si60) der Firma Merck (Darmstadt) verwendet. Die Flussrate betrug 1 ml/min unter Verwendung eines n-Heptan/Isopropanol-Gemisches (99+1; v+v) als mobile Phase. Die Detektion erfolgte über die Eigenfluoreszenz der Tocopherole bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 290\text{ nm}$ und einer Emissionswellenlänge von $\lambda = 328\text{ nm}$. Ein Vergleich der Retentionszeiten mit Hilfe von Standardsubstanzen (Merck, Darmstadt) diente zur Identifizierung. Die Standardsubstanzen wurden auch für die externe Kalibrierung verwendet. Die hieraus berechneten Koeffizienten standen zur Berechnung der Tocopherolgehalte zur Verfügung.

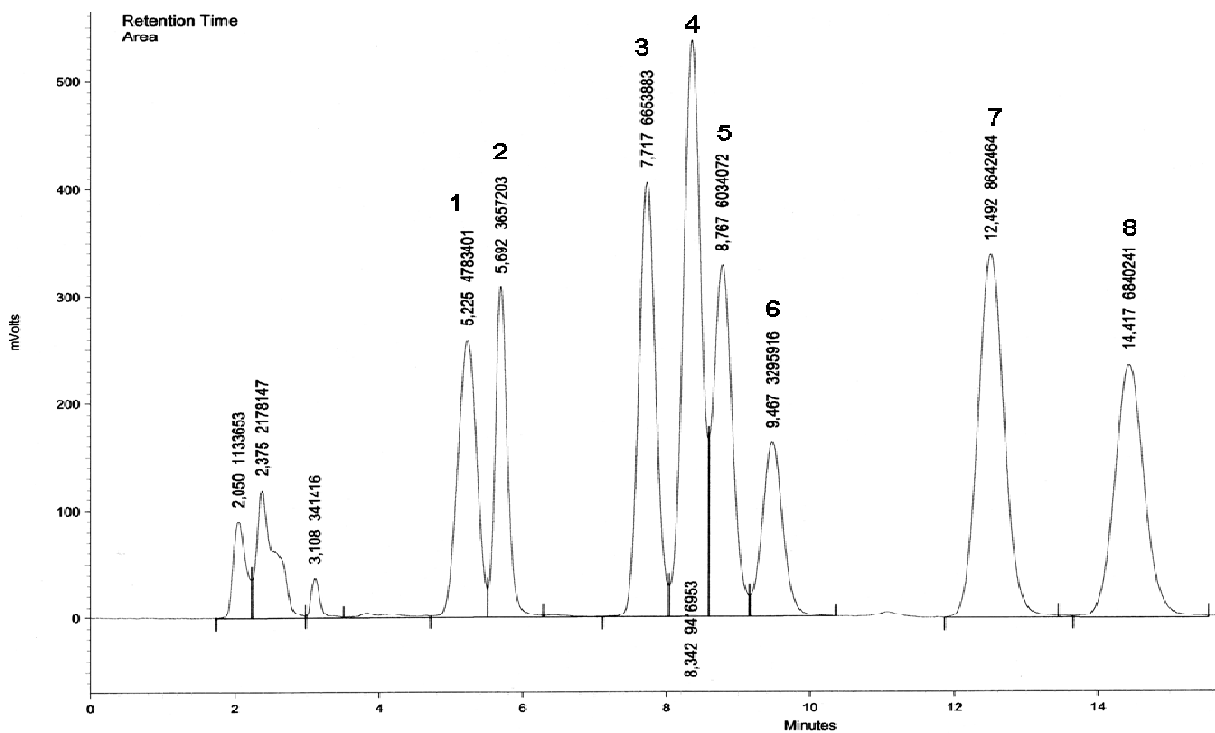


Abbildung 6: Beispiel eines HPLC-Chromatogramms des Tocochromanol-Standards. 1: α -Tocopherol, 2: α -Tocotrienol, 3: β -Tocopherol, 4: γ -Tocopherol, 5: β -Tocotrienol, 6: γ -Tocotrienol, 7: δ -Tocopherol, 8: δ -Tocotrienol

3. Ergebnisse

Der Ergebnisteil behandelt zwei Themen. Der erste Teil befasst sich mit der Bestimmung des Tocopherol-Gehaltes in Rapssamen. Im zweiten Teil wird die Isolierung und Charakterisierung von *B. napus* Sequenzen mit Homologie zu den *A. thaliana* Genen *PDS1*, *VTE4* und *APG1* beschrieben.

3.1. Bestimmung des Tocopherol-Gehaltes in Rapssamen

Klassische Züchtungsstrategien setzen voraus, dass für das entsprechende Merkmal genetische Variabilität vorliegt. In einer früheren Publikation (Goffman und Becker 2002) wurde der Samen-Tocopherol-Gehalt für Winterrapsherkünfte und Resyntheseraps mit 182 mg/kg bis 367 mg/kg angegeben. Zur Abschätzung der Variabilität des Tocopherol-Gehaltes und der Tocopherol-Zusammensetzung in aktuellem Zuchtmaterial wurden Saatgutproben von 76 Rapsherkünften untersucht (siehe Anhang, Tabelle 24).

Diese Saatgutproben stammten aus Zuchtmaterial der NPZ (Norddeutsche Pflanzenzucht, Hans-Georg Lembke KG, Holtsee). Das Material setzte sich aus 58 Winterraps- und 18 Sommerraps-Herkünften zusammen. Die Tocopherol-Gehalte wurden durch zwei unabhängige Messungen mittels HPLC, wie in Kapitel 2.10 beschrieben, bestimmt.

Die ermittelten Samen-Tocopherol-Gehalte der Winterrapsherkünfte lagen im Bereich zwischen 215 mg/kg und 510 mg/kg. Die Tocopherol-Gehalte der Sommerrapsherkünfte lagen zwischen 198 mg/kg und 395 mg/kg (Abbildung 7A, Einzelmesswerte siehe Anhang Tabelle 24). Die Einteilung der Herkünfte in Klassen ergab für die Winterrapsherkünfte eine bimodale Verteilung mit Maxima in den Bereichen 251 mg/kg bis 300 mg/kg und 451 mg/kg bis 500 mg/kg (Abbildung 7A). Die Sommerrapsherkünfte zeigten eine leicht rechtsgipfelige Verteilung mit einem Maximum im Bereich 301 mg/kg bis 350 mg/kg.

Im Rapssamen werden α -, γ - und kleine Mengen δ -Tocopherol gespeichert. Aus ernährungsphysiologischer Sicht ist α -Tocopherol die bedeutendste Komponente mit der höchsten Vitamin E-Aktivität. In der Literatur wurden für das Verhältnis α -/ γ -Tocopherol Werte zwischen 0,36 und 1,329 beschrieben (Goffman und Becker 2002). In den hier untersuchten 76 Rapsherkünften lagen die Werte für das α -/ γ -Tocopherol-Verhältnis zwischen 0,10 und 0,27 (Abbildung 7B). Sowohl die Sommerrapsherkünfte als auch die Winterrapsherkünfte zeigten in der Häufigkeitsverteilung ein Maximum in der Klasse 0,16 - 0,18 (Abbildung 7B).

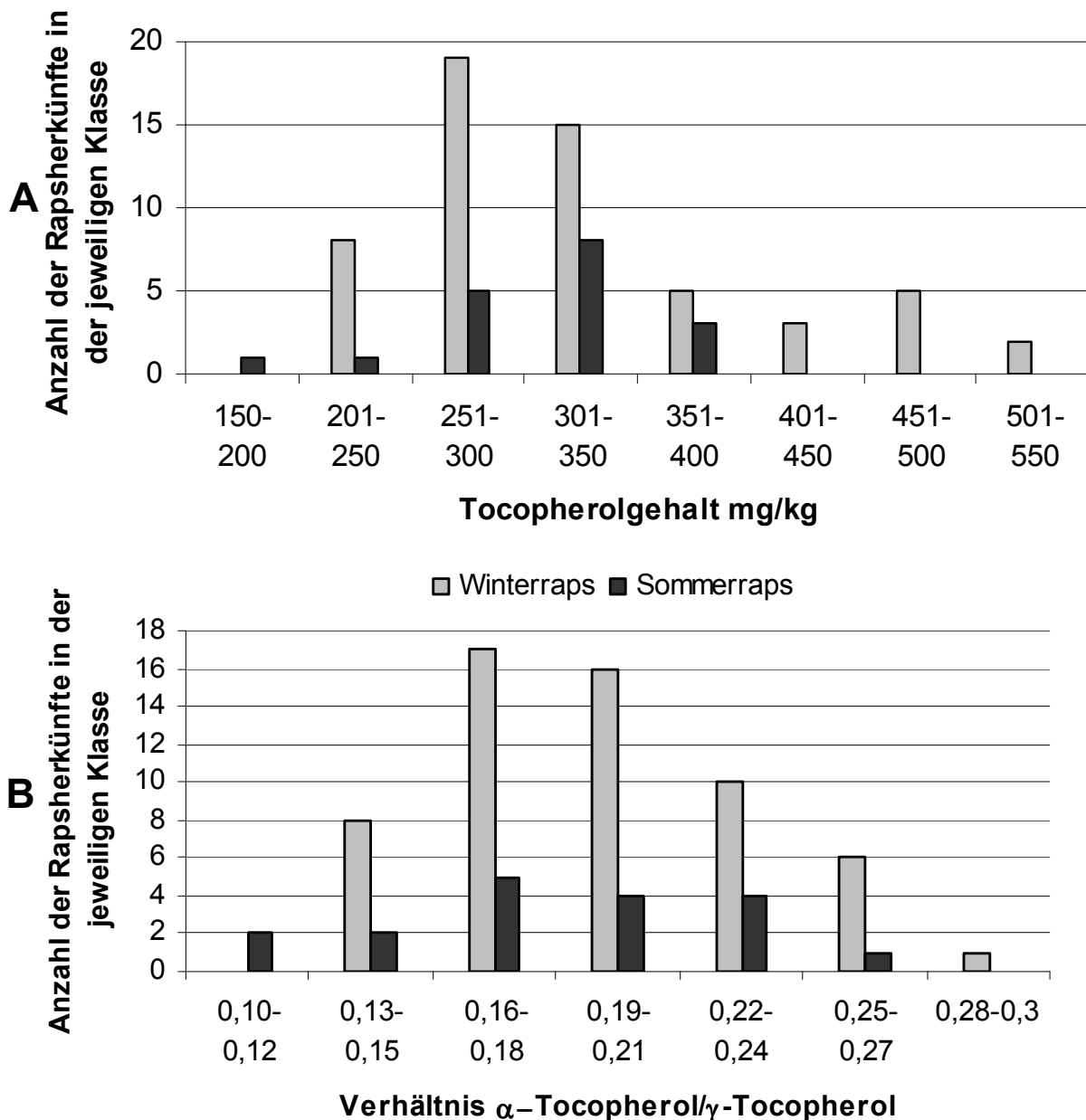


Abbildung 7: Tocopherol-Untersuchungen in 58 Winterraps- und 18 Sommerraps-Herkünften. Die Bestimmung der Tocopherolgehalte erfolgte mittels HPLC-Analyse (vergl. Kapitel 2.10). Die Zuordnung in die Klassen erfolgte aufgrund der Mittelwerte aus zwei Messungen. (A) Verteilung aufgrund des Tocopherolgehaltes (B) Verteilung aufgrund des α -Tocopherol/ γ -Tocopherol-Verhältnisses.

3.2. Isolierung und Charakterisierung von *B. napus* Sequenzen mit Homologie zu den *A. thaliana* Genen *PDS1*, *VTE4* und *APG1*

Die Gene der Tocopherolbiosynthese wurden ursprünglich aus *A. thaliana* und *Synechocystis* sp. PCC 6803 kloniert. In den letzten Jahren konnten orthologe Gene und homologe ESTs in weiteren Pflanzenarten identifiziert werden. Diese

Sequenzinformationen sind in öffentlichen Datenbanken zugänglich und dienen als Grundlage zur Isolierung der Tocopherolbiosynthese-Gene aus Raps.

Durch die nahe Verwandtschaft von *A. thaliana* und *B. napus* boten sich die Arabidopsis-Sequenzen als Referenzsequenzen an. Die Identifikation homologer Sequenzen aus *B. napus* erfolgte über PCR-basierende Methoden.

- Durch direkte Nutzung der Arabidopsis Sequenzen zum Ableiten von Primern wurden partielle Fragmente amplifiziert. Hierzu wurde die *A. thaliana* Sequenz mit orthologen Sequenzen anderer Pflanzenarten verglichen (AlignX, Invitrogen) und Primer aus konservierten Bereichen der Gene abgeleitet.
- Primer zur Amplifizierung von Vollängensequenzen wurden durch Ableiten aus *Brassica sp.* ESTs oder genomischen Sequenzen (GSSs) mit Homologie zu dem entsprechenden *A. thaliana* Gen erhalten. Die EST und GSS Sequenzen wurden mittels WU-BLAST der *A. thaliana* Gene gegen die Brassica (DNA) Datenbank ermittelt. Zusätzlich wurden über RACE-Amplifikationen neue *B. napus* Sequenzinformationen erhalten, die zum Ableiten von Primern dienen.

Die Ergebnisse zur Isolierung und Charakterisierung homologer Sequenzen aus *B. napus* werden für die Gene *PDS1*, *VTE4* und *APG1* in den folgenden Kapiteln nacheinander dargestellt.

3.2.1. Isolierung und Charakterisierung von *B. napus* Sequenzen mit Homologie zum *A. thaliana* Gen *PDS1*

Der erste Schritt in der Tocopherol-Biosynthese ist die Umwandlung von p-Hydroxyphenylpyruvat in Homogentisat (Abbildung 2). Dieser Syntheseschritt erfolgt im Cytoplasma und wird von dem Enzym HPPD katalysiert. Für dieses Gen kodiert in *A. thaliana* das Gen *PDS1* am Locus At1g06570. Für diesen Locus sind in der Genbank zehn Vollängen-cDNA-Sequenzen mit widersprüchlichen Angaben zur Länge des Leserahmens hinterlegt. Diese zehn *A. thaliana*-Vollängen-Sequenzen wurden zusammen mit der genomischen Sequenz mit Hilfe des Programms AlignX der Vector NTI-Software (Invitrogen) verglichen. Die Informationen zu den *PDS1*-Sequenzen aus *A. thaliana* Sequenzen sowie von weiteren Pflanzenarten sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Der Vergleich der zehn *A. thaliana* Sequenzen ergab, dass die Sequenzen AF060481, AY136294 und BX813446 Unterschiede zur Konsensussequenz aufweisen. Der Unterschied in AF060481 ist die beschriebene Deletion von 17 bp, welche die *knock-out*-Mutation dieses Gens widerspiegelt (Norris et al. 1998). Die Sequenz AY136294 zeigt an zwei Positionen einen Basenaustausch (453: A→G, 766: G→A). In einem Fall würde dies zu einem Aminosäureaustausch von Aspartat zu Asparagin führen. Die

Sequenz BX813446 zeigt eine Vielzahl von Polymorphismen. Bei dieser Sequenz handelt es sich allerdings um eine *single-pass-read*-Sequenz, die nicht abgesichert ist. Bei neun dieser *A. thaliana* Sequenzen handelt es sich um Sequenzen des Ökotyps Columbia, während eine Sequenz vom Ökotyp Wassilewskija erhalten wurde. Auffallend ist, dass es keinen Sequenzunterschied zwischen den Ökotypen gibt.

Tabelle 11: Vollängen cDNA-Sequenzen des *A. thaliana*-Gens *PDS1* sowie homologer Sequenzen weiterer Pflanzenarten und genomische Sequenz der *pds1*-Mutante aus *A. thaliana*. Angegeben sind die Akzessionsnummer, das Ausgangsmaterial aus der die Sequenz abgeleitet wurde, die Art und der Ökotyp, das Datum der letzten Aktualisierung des Datenbankeintrags und die in der Datenbank angegebene Länge des Leserahmens. k.A.: keine Angabe

Akzessions-Nummer	Ausgangsmaterial	Art/Ökotyp	letzte Aktualisierung	Leserahmen laut Genbank (bp)
AF000228	mRNA	<i>A. thaliana</i> Columbia	Mai 1997	1338 ¹
AF047834	mRNA	<i>A. thaliana</i> Columbia	Mai 1999	1338 ¹
AF060481	genomische DNA <i>pds1</i> -Mutante	<i>A. thaliana</i> Columbia	Oktober 1998	1260 ²
AF428446	mRNA	<i>A. thaliana</i> Columbia	Oktober 2001	1338
AY072329	mRNA	<i>A. thaliana</i> Columbia	Januar 2002	1338
AY128745	PCR von AY072329	<i>A. thaliana</i> Columbia	August 2002	1338
AY136294	mRNA	<i>A. thaliana</i> Columbia	August 2002	1422
BX813446	mRNA aus Blüten und Knospen <i>single pass read</i>	<i>A. thaliana</i> Columbia	Februar 2004	k.A.
NM_100536	mRNA	<i>A. thaliana</i> Columbia	April 2007	1422 ³
U89267	mRNA aus Keimlingen	<i>A. thaliana</i> Wassilewskija	September 1997	1338
AY138969	DNA	<i>Abutilon theophrasti</i>	Oktober 2002	1211
DQ886526	mRNA	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i>	September 2006	1322
AJ309203	mRNA	<i>Solenostemon</i> <i>scutellarioides</i>	April 2001	1311
DCU87257	mRNA	<i>Daucus carota</i>	September 1997	1329
EF608178	mRNA	<i>Glycine max</i>	Juni 2007	1332
AJ000693	mRNA Primärblatt	<i>Hordeum vulgare</i>	Februar 2003	1305
AY957391	mRNA Blatt	<i>Medicago truncatula</i>	Mai 2006	1314
AP005804	DNA	<i>Oryza sativa</i>	Juni 2004	1342
DQ139267	mRNA	<i>Triticum aestivum</i>	August 2005	1311
AM423697	DNA	<i>Vitis vinifera</i>	Mai 2007	1339
AJ634707	mRNA	<i>Zea mays</i>	Januar 2007	1336

¹ Funktion nachgewiesen, ² Null-Mutante, ³ cDNA auf die von der genomischen Sequenz verwiesen wird

Die Länge für den Leserahmen wird mit 1338 bp oder 1422 bp angegeben. Obwohl von der genomischen Sequenz (At1g06570) auf die Sequenz NM_100536 mit einem Leserahmen von 1422 bp verwiesen wird, wurde in den Studien von Garcia et al. (1999)

und Norris et al. (1998) die Funktion der 1338 bp langen Sequenz nachgewiesen. Auch die Analyse der Sequenz NM_100536 mit dem Programm Genscan (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) ergab einen ORF (*open reading frame*) von 1338 bp. In den weitergehenden Untersuchungen wurde daher als Referenzsequenz für den Leserahmen des *PDS1*-Gens der 1338 bp umfassende Sequenzbereich ab Position 87 der Sequenz NM_100536 zugrunde gelegt. Die Struktur des Gens *PDS1* ist in Abbildung 8A (Kap.3.2.1.1) dargestellt. Das Gen besteht aus zwei Exons getrennt von einem 107 bp langen Intron. Es kodiert für ein 445 Aminosäuren langes Polypeptid welches Domänenmerkmale der Glyoxalase-/ Dioxygenase-Superfamilie aufweist.

3.2.1.1. PCR Experimente zur Isolierung von *B. napus* Sequenzen mit Homologie zum *A. thaliana* Gen *PDS1*

Die Primer zur Amplifizierung von *B. napus* Sequenzen mit Homologie zum *A. thaliana* Gen *PDS1* wurden als Konsensusprimer aus den *PDS1* Sequenzen von Arabidopsis (NM_100536), von Gerste (AJ000693) und von Karotte (DCU87257) abgeleitet. Die Sequenzen wurden mit dem Programm AlignX der Vector NTI Software (Invitrogen) verglichen und geeignete Primerbindungsstellen aus konservierten Bereichen identifiziert. Hieraus wurden die Primer pds 1fw und pds 1rv abgeleitet (Tabelle 9), mit denen in *A. thaliana* ein 791 bp langes Fragment aus dem ersten Exon zu erwarten war (Abbildung 8A). Weiterhin wurde die *A. thaliana* *PDS1* Sequenz verwendet, um die Brassica (DNA) Datenbank mittels WU-BLAST unter Verwendung des BLASTN-Algorithmus zu durchsuchen. Die Brassica-Sequenzen CD825586 und BZ10774 konnten identifiziert werden und die Primer pds 2fw und pds 2rv (Tabelle 9) wurden aus diesen Sequenzen abgeleitet (Abbildung 8A).

Zur Überprüfung, ob die Primer zur Amplifizierung homologer Fragmente des *PDS1*-Gens aus Raps einsetzbar sind, wurden PCR Reaktionen mit den Primerkombinationen pds 1fw und pds 1rv sowie pds 2fw und pds 2rv durchgeführt (Tabelle 9). Die resultierenden, genomischen Produkte aus Raps und Arabidopsis wurden im Agarosegel aufgetrennt. Für die erste Primerkombination wurde aus Arabidopsis ein Amplifikat erwarteter Größe erhalten (Abbildung 8B). Für Raps konnte ebenfalls eine einzelne Bande detektiert werden, welche eine im Vergleich zu Arabidopsis nahezu identische Länge aufwies (Abbildung 8B). Das mit der Primerkombination pds 1fw und pds 1rv erhaltene Fragment aus Raps wird im Folgenden als *BnPDS1*-750 bezeichnet.

Für die zweite Primerkombination (pds 2fw und pds 2rv) konnte ebenfalls mit Raps-DNA eine einzelne Bande erhalten werden (Abbildung 8C). Aus Arabidopsis war eine Amplifizierung mit diesen Primern nicht möglich. Die Länge des entstandenen Rapsfragments, welches im Weiteren als *BnPDS1*-1500 bezeichnet wird, betrug circa 1500 bp (Abbildung 8C). Die 1500 bp entsprechen in etwa der Länge des Arabidopsis *PDS1*-Gens vom Start- bis Stoppkodon inkl. Intron (Abbildung 8A). Zur Überprüfung ob es sich bei den Rapsfragmenten *BnPDS1*-750 und *BnPDS1*-1500 um *PDS1*-Homologe handelte, wurden die PCR-Produkte aus dem Gel ausgeschnitten,

aufgereinigt und sequenziert. Für das Fragment *BnPDS1-750* wurde eine monomorphe Sequenz (Klon Nr. 3483) von 735 bp erhalten. Inklusive der beiden Primer von je 19 bp betrug die gesamte Fragmentgröße 773 bp und war damit um 18 bp kürzer als das entsprechende Fragment aus *Arabidopsis*. Für das Fragment *BnPDS1-1500* wurde eine monomorphe Sequenz (Klon Nr. 3484) von 1555 bp Länge erhalten. Die beiden Raps Sequenzen sind im Vergleich zur genomischen und zur mRNA Sequenz des *A. thaliana* Gens *PDS1* im Anhang (Abbildung 31) dargestellt.

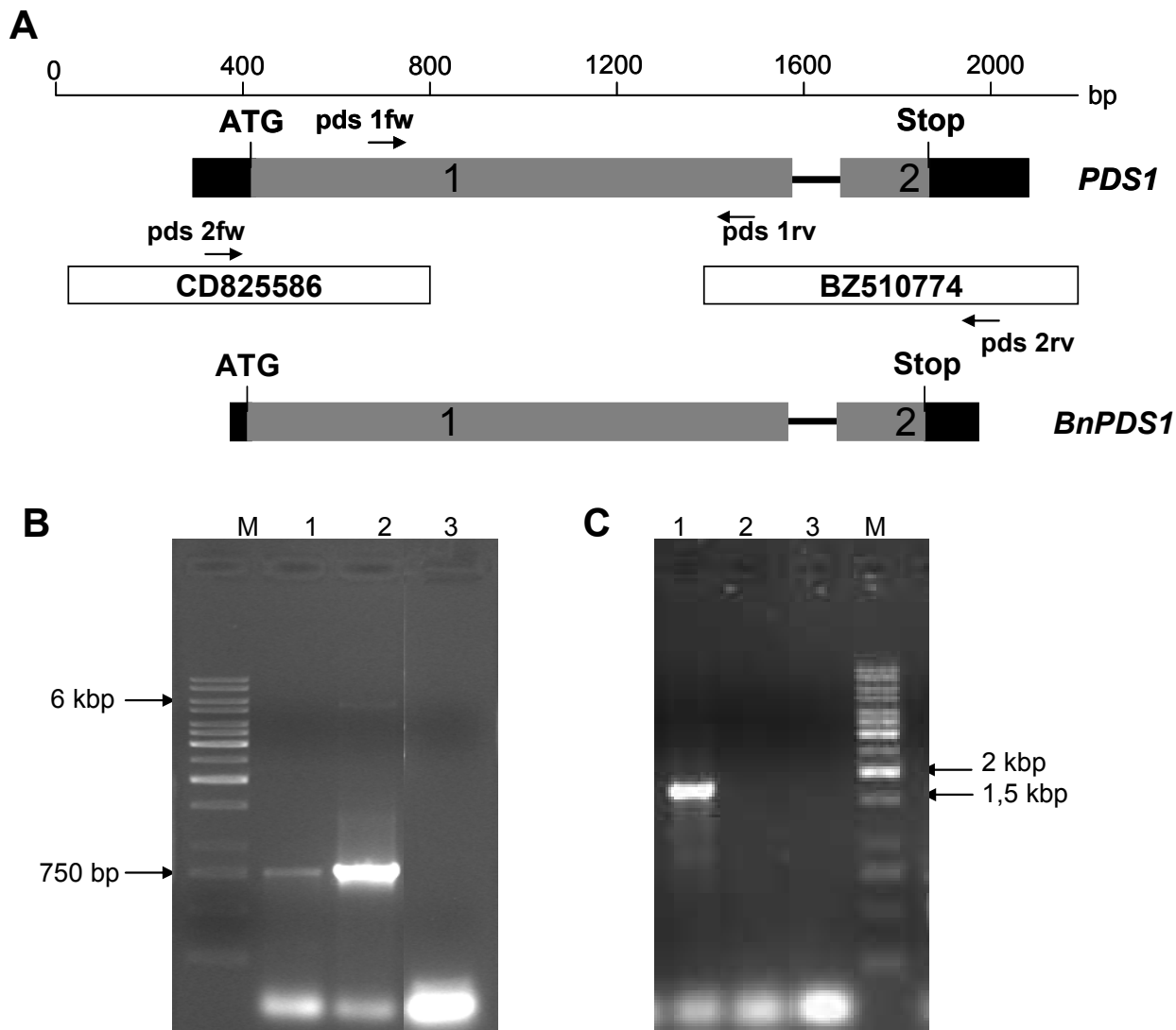


Abbildung 8: Lage und Überprüfung der Primer zur Amplifizierung von *B. napus* Sequenzen mit Homologie zum *A. thaliana* Gen *PDS1*. (A) Schematische Darstellung des *A. thaliana* *PDS1* Gens und Lage der homologen Sequenzen CD825586 (*B. napus* EST) und BZ510774 (*B. oleracea* GSS), ermittelt aus WU-BLAST gegen die Brassica (DNA) Datenbank sowie der ermittelten Sequenz *BnPDS1*. Pfeile: Primerbindungsstellen; schwarz: nicht translatierte Sequenz, grau: translatierte Sequenz; dünner Balken: nicht transkribierte Sequenz, dicker Balken: transkribierte Sequenz, weißer Kasten: Homologe *Brassica* Sequenz, Ziffer: Exonnummer. (B) Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate aus einer PCR mit den Primern pds 1fw und pds 1rv in einem 1 %igen Agarosegel bei 60 V für 60 Minuten. Spur 1: Raps DNA, Spur 2: Plasmid-DNA mit *A. thaliana* *PDS1* (Plasmid Nr. 3482), Spur 3: Nullkontrolle mit Wasser, M: kB-Leiter. (C) Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte aus einer PCR mit den Primern pds 2fw und pds 2rv in einem 0,8 %igen Agarosegel bei 60 V für 60 Minuten. Spur 1: Raps DNA, Spur 2: Arabidopsis DNA, Spur 3: Nullkontrolle mit Wasser, M: kB-Leiter

In Tabelle 12 sind die Ergebnisse des Sequenz-Vergleichs zwischen der *A. thaliana* *PDS1* Sequenz und den Sequenzen der *B. napus*-Fragmente zusammengefasst. Das Fragment *BnPDS1*-750 zeigte eine 79 %ige Homologie zur entsprechenden *A. thaliana* Sequenz. Die 735 Basen entsprechen 55 % des kodierenden Bereichs des *PDS1*-Gens aus Arabidopsis. Das PCR-Produkt war direkt sequenzierbar. Es wurde nach Analyse der Sequenzierresultate kein Hinweis darauf gefunden, dass sich hinter der einen Bande, die im Agarosegel sichtbar war, mehrere Fragmente identischer Größe verbargen. Der Vergleich mit der Sequenz vom *BnPDS1*-1500 Fragment zeigte, dass die beiden Sequenzen zwar homolog sind, aber dennoch eindeutige Sequenzunterschiede aufweisen. Der Vergleich des *BnPDS1*-1500 Fragments mit dem kodierenden Bereich des Arabidopsis-Gens zeigte, dass sowohl Start- als auch Stoppkodon von der *B. napus* Sequenz abgedeckt wurden. Weiterhin ist zu sehen, dass auch der Intronbereich des Gens von der *B. napus* Sequenz abgedeckt wurde. Im weiteren wird diese Sequenz als *BnPDS1* bezeichnet.

Tabelle 12: Übersicht der hier klonierten Raps Sequenzen mit Homologie zum *A. thaliana* Gen *PDS1*

Bezeichnung	Klon Nr.	Art der Sequenz	Länge (bp)	Start bei Nukleotid Nr. ¹	Ähnlichkeit zu <i>PDS1</i> (%)
<i>BnPDS1</i> -750	3483	genomisch	735	307	79%
<i>BnPDS1</i> -1500	3484	genomisch	1555	-78	78%

¹ Berechnet vom Startkodon der genomischen *A. thaliana* Sequenz

Der Vergleich der *BnPDS1* Sequenz mit der *A. thaliana* *PDS1* Sequenz und die Analyse mit dem Programm GeneSeqer

(www.plantgdb.org/PlantGDBcgi/GeneSeqer/PlantGDBgs.cgi) ergaben, dass die *BnPDS1* Sequenz aus zwei Exons (Positionen 126 – 1225 und 1302 – 1546) und einem 76 bp Intron besteht (Abbildung 8A). Die Homologie zwischen der Arabidopsis- und der Raps Sequenz beträgt 78 %. Der aus diesen Analysen ermittelte offene Leserahmen von 1323 bp für *BnPDS1* würde für ein 440 AS langes Polypeptid (BnPDS1) kodieren, welches eine 92 %ige Homologie zur HPPD (AthPDS1) aufweist (Abbildung 9). Die Analyse der Aminosäuresequenz von BnPDS1 gegen die pfam Datenbank (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) ergab, dass die BnPDS1 Sequenz die erwarteten Domänenmerkmale der Glyoxalase-/ Dioxygenase-Superfamilie aufweist.

BnPDS1	(1)	MGHE [■] NAAV [■] CE [■] T [■] Q [■] Q [■] HDDAAS--PGFKLVGFSK [■] FVRKNPKSDK [■] FKV [■] KRF [■] HHI
AthPDS1	(1)	MGH [■] Q [■] NAAV [■] SE [■] N [■] Q [■] NHDDGAASSPGFKLVGFSK [■] FVRKNPKSDK [■] FKV [■] KRF [■] HHI
BnPDS1	(49)	EFWCGDATNVS [■] RRFSWGLGMRFS [■] AKSDLSTGNMVHAS [■] YLLTSGDLR [■] FLFT
AthPDS1	(51)	EFWCGDATNVA [■] RRFSWGLGMRFS [■] AKSDLSTGNMVHAS [■] YLLTSGDLR [■] FLFT
BnPDS1	(99)	APYSPSL [■] SAGEA [■] Q [■] PS [■] ATASIP [■] SFDH [■] ASCRS [■] FFSSH [■] GLG [■] VRAVA [■] IEVEDAE
AthPDS1	(101)	APYSPSL [■] SAGEI [■] K [■] PT [■] TTASIP [■] SFDH [■] G [■] SCRS [■] FFSSH [■] GLG [■] VRAVA [■] IEVEDAE
BnPDS1	(149)	SAF [■] SISVANGA [■] VPSS [■] PPN [■] VLN [■] GAVT [■] IAEVKLYGDV [■] VLRV [■] SY [■] YNGTVS--
AthPDS1	(151)	SAF [■] SISVANGA [■] VPSS [■] PPI [■] VLN [■] EAVT [■] IAEVKLYGDV [■] VLRV [■] SY [■] KAEDTEKS
BnPDS1	(197)	-FL [■] PGF [■] ES [■] VDD [■] TS [■] SFPLDY [■] GIRRLD [■] HAVGN [■] VP [■] ELGPALTY [■] LAGFT [■] GFHQ [■] F
AthPDS1	(201)	EFL [■] PGFER [■] VEDA [■] SS [■] FP [■] LDY [■] GIRRLD [■] HAVGN [■] VP [■] ELGPALTY [■] VAGFT [■] GFHQ [■] F
BnPDS1	(246)	AEFTADDV [■] GTAE [■] SGLNSAV [■] LAN [■] NDEM [■] VLLP [■] INE [■] PVHG [■] TKRKS [■] QI [■] QT [■] YLEH
AthPDS1	(251)	AEFTADDV [■] GTAE [■] SGLNSAV [■] LAS [■] NDEM [■] VLLP [■] INE [■] PVHG [■] TKRKS [■] QI [■] QT [■] YLEH
BnPDS1	(296)	NEGAGL [■] QHLAL [■] MSEDI [■] FRTL [■] REMR [■] KRS [■] G [■] VGG [■] DFM [■] PS [■] PP [■] TY [■] Y [■] Q [■] NL [■] KKR [■] V
AthPDS1	(301)	NEGAGL [■] QHLAL [■] MSEDI [■] FRTL [■] REMR [■] KRS [■] S [■] I [■] GG [■] DFM [■] PS [■] PP [■] TY [■] Y [■] Q [■] NL [■] KKR [■] V
BnPDS1	(346)	GDV [■] LSE [■] EQ [■] IE [■] ECEEL [■] GILV [■] DRDD [■] QGTLL [■] Q [■] IFTK [■] PLG [■] DRPT [■] IFIE [■] II [■] Q [■] RVG
AthPDS1	(351)	GDV [■] LSDD [■] Q [■] IK [■] ECEEL [■] GILV [■] DRDD [■] QGTLL [■] Q [■] IFTK [■] PLG [■] DRPT [■] IFIE [■] II [■] Q [■] RVG
BnPDS1	(396)	CM [■] K [■] DEEG [■] K [■] VY [■] QSGG [■] CGG [■] FG [■] KGN [■] FSEL [■] F [■] KS [■] IEE [■] YE [■] KT [■] LEAK [■] Q [■] LVG
AthPDS1	(401)	CM [■] M [■] DEEG [■] K [■] AY [■] QSGG [■] CGG [■] FG [■] KGN [■] FSEL [■] F [■] KS [■] IEE [■] YE [■] KT [■] LEAK [■] Q [■] LVG

Abbildung 9: Vergleich der abgeleiteten BnPDS1 Aminosäuresequenz mit der Sequenz der *A. thaliana* HPPD (AthPDS1). Erstellt mit dem AlignX Programm der Vector NTI Software. Identische Aminosäuren sind schwarz hervorgehoben, ähnliche Aminosäuren sind grau hervorgehoben, grauer Balken Glyoxalase-/ Dioxygenase-Superfamilie-Domäne.

Zur Einordnung der *BnPDS1* Sequenz wurde sie mittels AlignX-Analyse der Vector NTI Software mit weiteren pflanzlichen cDNA-Sequenzen für *PDS1*-Gene (Tabelle 11) verglichen. Der phylogenetische Baum der sich aus dieser Analyse ergab, ist in Abbildung 10 dargestellt. Aus der Abbildung ist abzulesen, dass die *BnPDS1* Sequenz die größte Ähnlichkeit zu *B. rapa* und *A. thaliana* aufweist.

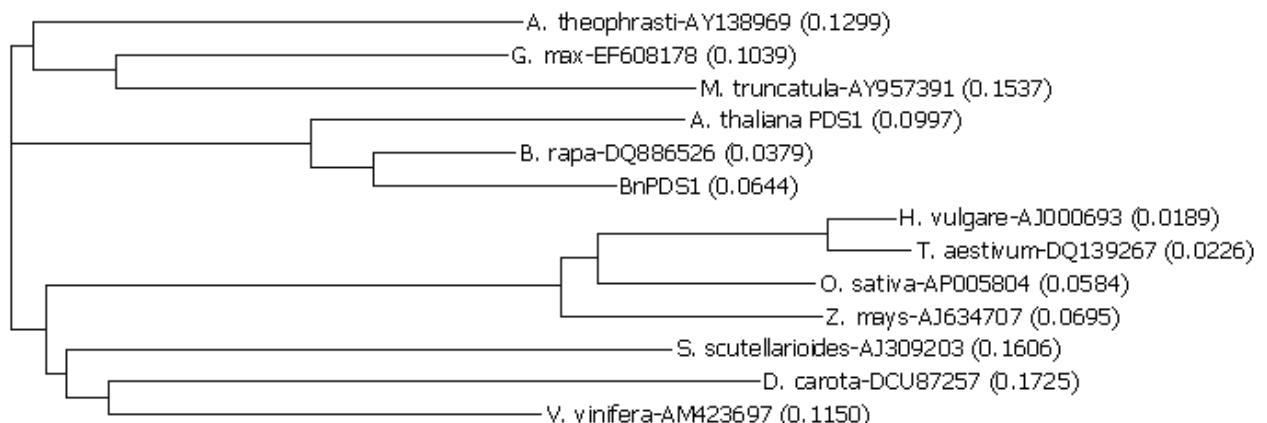


Abbildung 10: Phylogenetischer Baum verschiedener pflanzlicher cDNA Vollängensequenzen (vergl. Tabelle 11) mit Homologie zum *PDS1*-Gen sowie der hier klonierten Sequenz *BnPDS1*. Zur Erstellung wurde das Programm AlignX der Vector NTI Software (Invitrogen) verwendet. Die Berechnung erfolgt nach der *Neighbor Joining* Methode (NJ). Die berechneten Distanzen stehen in Klammern hinter den Sequenz-Bezeichnungen.

3.2.1.2. Untersuchungen zur Expression des *BnPDS1* Gens

Es wurde eine RT-PCR durchgeführt, um zu prüfen, ob und in welchen Geweben das *BnPDS1*-Gen exprimiert wird. Außerdem wurden die identifizierten genomischen Sequenzen *BnPDS1*-750 und *BnPDS1*-1500 verwendet, um damit die Expression *in silico* nachzuweisen. Hierzu wurden sie mit öffentlichen *B. napus* ESTs verglichen. Die erwartete Größe der RT-PCR-Produkte mit den Primern pds 1fw und pds 1rv (Tabelle 9) betrug 773 bp (vergl. Abbildung 8). Für alle drei untersuchten Proben wurde ein Fragment erwarteter Größe erhalten (Abbildung 11). Die Ergebnisse der RT-PCR zeigten, dass das *BnPDS1*-750 Fragment in Blatt-, Samen- und Schotenwandgewebe exprimiert wird.

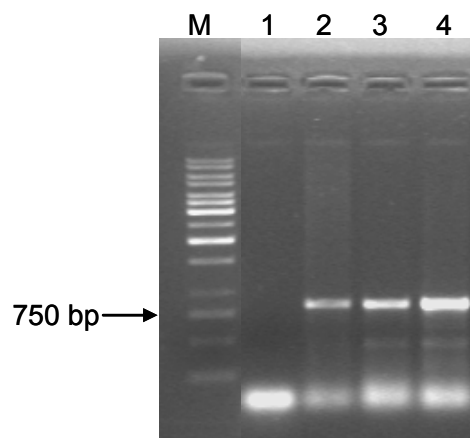


Abbildung 11: Gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR-Produkte im 1 %igen Agarosegel bei 60 V für 60 Minuten. Die Erststrangsynthese erfolgte aus 0,9 µg – 1,5 µg Raps-RNA mittels oligo(dT)-Primern mit dem SuperScript™ First-Strand Synthesis-System (Invitrogen). Die PCR Reaktion erfolgte mit den Primern pds 1fw und pds 1rv (Tabelle 9). Spur 1: Null-Kontrolle mit Wasser, Spur 2: Blätter, Spur 3: Samen, Spur 4: Schotenwand, M: kB-Leiter

Der Sequenzvergleich der in dieser Arbeit identifizierten Rapssequenzen der Fragmente *BnPDS1*-750, *BnPDS1*-1500 und der hieraus abgeleiteten kodierenden Sequenz mit öffentlich verfügbaren *B. napus* ESTs ist im Anhang dargestellt (Abbildung 31). Das Ergebnis des Sequenzvergleichs ist in Tabelle 13 zusammengefasst. Die in der Datenbank hinterlegten Sequenzen aus Samen und Knospen zeigen eine hohe Homologie zu den in dieser Arbeit identifizierten genomischen Sequenzen. Dieses Ergebnis bestätigt die mittels RT-PCR gezeigte Expression der *BnPDS1* Sequenz in Samen. Die Datenbankanalyse ergab darüber hinaus, dass auch in Knospen und Blüten von Raps eine Expression des Gens gefunden wurde. Die Sequenz DY006812, bei der keine Angabe zur Rapsorte vorlag, zeigte über 660 bp eine 100 %ige Homologie zur *BnPDS1*-1500 Sequenz. Die Sequenz CX187504 wurde ebenso wie die in dieser Arbeit beschriebene Sequenz aus der Sorte „Express“ erhalten. Die Sequenzunterschiede zu *BnPDS1*-1500 beschränkten sich auf den Anfang und das Ende der CX187504 Sequenz. Diese beiden Sequenzen lassen auf eine wahrscheinliche Expression der *BnPDS1*-1500 Sequenz schließen. Die Unterschiede zwischen den beiden aus Samen gewonnen

Sequenzen der Sorte „Jet Neuf“ geben einen zusätzlichen Hinweis darauf, dass mehr als eine *PDS1*-homologe Sequenz in Raps exprimiert wird.

Als Ergebnis wurde festgestellt, dass in Samen, Schotenwänden, Blättern und Knospen mindestens eine Kopie des *BnPDS1*-Gens exprimiert wird. Die in der Datenbank hinterlegten ESTs zeigen höhere Homologie zum *BnPDS1*-1500 Fragment als zum *BnPDS1*-750 Fragment. Für Letzteres konnte jedoch mittels RT-PCR die Expression nachgewiesen werden. Beide in dieser Arbeit identifizierten *BnPDS1* Sequenzen überspannten einen 114 bp langen Bereich für den bis heute kein *B. napus* EST beschrieben worden war.

Tabelle 13: Übersicht der *B. napus* ESTs mit Homologie zum *PDS1* Gen. Ermittelt durch WU-Blast gegen die Brassica (DNA) Datenbank. Dargestellt sind die Informationen zur Herkunft der ESTs sowie die Ergebnisse des Sequenzvergleichs mit den hier klonierten *BnPDS1* Sequenzen. k.A.: keine Angabe

EST	Rapssorte	Gewebe ¹	Länge (bp)	EST-Beginn bei Nukleotid Nr. ²	Homologie zu <i>BnPDS1</i> -1500 (%)	Homologie zu <i>BnPDS1</i> -750 (%)
DY006812	k.A.	Samen	661	666	100	95
CX187504	„Express“	Knospen und Blüten	375	755	97	91
DW999227	k.A.	Samen	569	808	91	89
CD833441	„Jet Neuf“	Samen	612	-45	89	87
CD825586	Jet Neuf	Samen	759	-429	96	85

¹ Gewebe aus dem die ESTs kloniert wurden, ² Beginn der EST-Sequenz in Bezug zum Startkodon des *BnPDS1*-Leserahmens

3.2.1.3. Southern-Analyse zur Bestimmung der Kopienzahl von *PDS1*-Homologen im Rapsgenom

Im Arabidopsisgenom liegt das *PDS1*-Gen in einer Kopie am Locus At1g06570 vor. Zur Abschätzung der Kopienzahl im Rapsgenom wurde restringierte genomische Raps-DNA mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Als Sonde diente das in Kapitel 3.2.1.1 beschriebene Fragment *BnPDS1*-750, das 50 % des Gens abdeckt. Das Ergebnis der Southern-Analyse ist in Abbildung 12 dargestellt. Abhängig von dem eingesetzten Restriktionsenzym wurden zwei bis vier Hybridisierungssignale erhalten. Die Analyse der *BnPDS1*-750 und *BnPDS1*-1500 Sequenzen ergab, dass keine internen Erkennungssequenzen der verwendeten Restriktionsenzyme vorhanden sind.

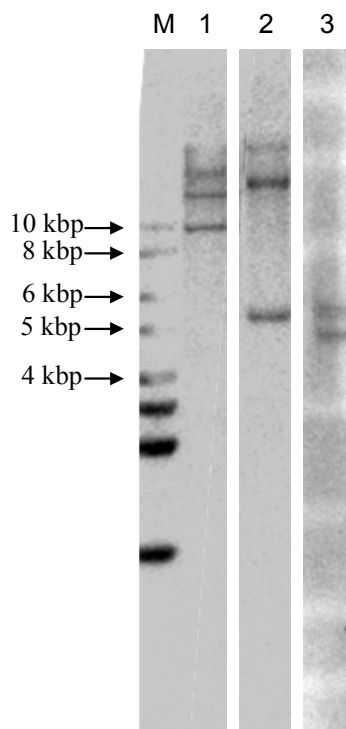


Abbildung 12: Southern-Hybridisierung der Sonde BnPDS1-750 mit genomischer Raps-DNA. Genomische DNA der Sorte „Express“ wurde mit drei Restriktionsendonukleasen verdaut, im Gel separiert, geblottet und mit der radioaktiv markierten Sonde BnPDS1-750 (Tabelle 7) hybridisiert. Die Auswertung erfolgte nach der Exposition des Filters auf einer Fotoplatte (eingelese mit dem FLA5000). Pro Spur sind zwischen zwei und vier Banden zu erkennen. Spur 1: *EcoRI*, Spur 2: *EcoRV*, Spur 3: *HindIII*, M: Marker

3.2.2. Isolierung und Charakterisierung von *B. napus* Sequenzen mit Homologie zum *A. thaliana* Gen *VTE4*

Die Umwandlung von γ - und δ -Tocopherol in α - und β -Tocopherol erfolgt in den Plastiden und wird von dem Enzym gTMT (γ -Tocopherol-Methyltransferase) katalysiert. Für dieses Enzym kodiert in *A. thaliana* das Gen *VTE4* am Locus At1g64970. Für diesen Locus sind in der Genbank sechs Vollängen-cDNA-Sequenzen hinterlegt (Tabelle 14). Die *A. thaliana*-Vollängen-Sequenzen wurden zusammen mit der genomischen Sequenz mit Hilfe des Programms AlignX der Vector NTI Software verglichen. Die Sequenzen AF1042201, AY087138 und BX814538 (Tabelle 14) zeigen Unterschiede zur Referenzsequenz NM_105171. Die Sequenz BX814538 weist einen Basenaustausch an Position 1021 (C→A) auf, allerdings ist diese Sequenz als single-pass-read-Sequenz nicht zuverlässig. Die Sequenzen AF104220 und AY087138 zeigen an zwei Positionen den gleichen Basenaustausch (345: T→C; 523: G→T). Der zweite Austausch führt zu einer Änderung in der Aminosäuresequenz von Alanin zu Serin. Die Sequenz AY087138 zeigt einen zusätzlichen Austausch an Position 562 (C→A), der zu einer geänderten Aminosäuresequenz von Glutamin zu Lysin führt. Interessanterweise zeigen die Sequenzen AF104220 und AY087138 im 3'-untranslatierten Bereich zwei weitere identische Polymorphismen zur Konsensussequenz. Diese Unterschiede weisen

auf ökotypenspezifische Polymorphismen hin. Zu der Sequenz AF104220 lag keine Angabe zum Ökotyp vor. Die Sequenz AY087138 stammt vom Ökotyp Wassilewskija oder Landsberg. Die Struktur des Gens *VTE4* ist in Abbildung 13A (Kap. 3.2.2.1) dargestellt. Das Gen besteht aus einem ORF von 1047 bp in 4 Exons, unterbrochen von drei Introns mit 451 bp, 72 bp und 87 bp Länge. Es kodiert für ein 348 AS langes Polypeptid mit einem 50 AS langen Plastiden-Transitpeptid und einer SAM-abhängigen Methyltransferase-Domäne.

Tabelle 14: Volllängen cDNA-Sequenzen des *A. thaliana*-Gens *VTE4* sowie homologer Sequenzen weiterer Pflanzenarten. Angegeben sind die Akzessionsnummer, das Ausgangsmaterial aus der die Sequenz abgeleitet wurde, die Art und der Ökotyp, das Datum der letzten Aktualisierung des Datenbankeintrags und die in der Datenbank angegebene Länge des Leserahmens. k.A: keine Angabe

Akzessions-Nummer	Ausgangsmaterial	Art/Ökotyp	letzte Aktualisierung	Länge des Leserahmens laut Genbank(bp)
AF104220	mRNA	<i>A. thaliana</i>	Januar 2006	1047
AY049258	mRNA	<i>A. thaliana</i> Columbia	August 2001	1047
AY087138	mRNA	<i>A. thaliana</i>	Januar 2006	1047
AY090280	mRNA	Columbia	März 2002	1047
BX814538	mRNA aus Blüten und Knospen <i>single pass read</i>	<i>A. thaliana</i> Columbia	Juni 2003	k.A.
NM_105171 ¹	mRNA	<i>A. thaliana</i> Columbia	April 2007	1047
DQ864978	mRNA	<i>B. juncea</i>	August 2006	1044
DQ508019	mRNA	<i>B. napus</i> "KenCl"	Mai 2006	1044
AF381248	mRNA	<i>B. oleracea</i>	Januar 2003	1044
DQ456880	mRNA	<i>Gossypium</i> <i>hirsutum</i>	April 2006	1035
AY960126	mRNA aus Blättern	<i>Glycine max</i>	April 2005	1053
DQ229832	DNA	<i>Helianthus annuus</i>	August 2006	945
DQ013360	mRNA	<i>Lotus japonicus</i>	Mai 2005	1077
DQ456876	mRNA	<i>Solanum</i> <i>lycopersicum</i>	April 2006	1089
AY962639	mRNA aus Blättern	<i>Medicago</i> <i>truncatula</i>	April 2005	1089
DQ456878	mRNA	<i>Oryza sativa</i>	April 2006	1089
NM_001054379	mRNA	<i>Oryza sativa</i>	Oktober 2006	1089
AF213481	mRNA aus Samen	<i>Perilla frutescens</i>	Dezember 2001	1110
DQ456877	mRNA	<i>Solanum</i> <i>tuberosum</i>	April 2006	1107
DQ139266	mRNA	<i>Triticum aestivum</i>	August 2005	1098
AJ634706	mRNA	<i>Zea mays</i>	Januar 2007	1059
DQ456879	mRNA	<i>Zea mays</i>	April 2006	1059

¹ cDNA auf die von der genomischen Sequenz verwiesen wird

3.2.2.1. PCR Experimente zur Isolierung von *B. napus* Sequenzen mit Homologie zum *A. thaliana* Gen *VTE4*

Zu Beginn dieser Arbeit lag neben der Arabidopsis Sequenz bereits ein Vollängen EST aus *B. oleracea* vor (AF381248). Über einen Vergleich dieser beiden Sequenzen sollten geeignete Stellen zum Ableiten von Konsensusprimern identifiziert werden. Hierzu wurden Bereiche mit möglichst hoher Homologie gewählt, außerdem sollte ein möglichst großer Bereich des Gens abgedeckt werden. Als Referenzsequenz diente aufgrund der näheren Verwandtschaft zu Raps die *B. oleracea* Sequenz. Es wurden die Primer *vte4* 1fw, *vte4* 2fw, *vte4* 1rv und *vte4* 2rv abgeleitet. Die Primersequenzen sind in Tabelle 9 dargestellt. Die Lage der Primer ist Abbildung 13A zu entnehmen.

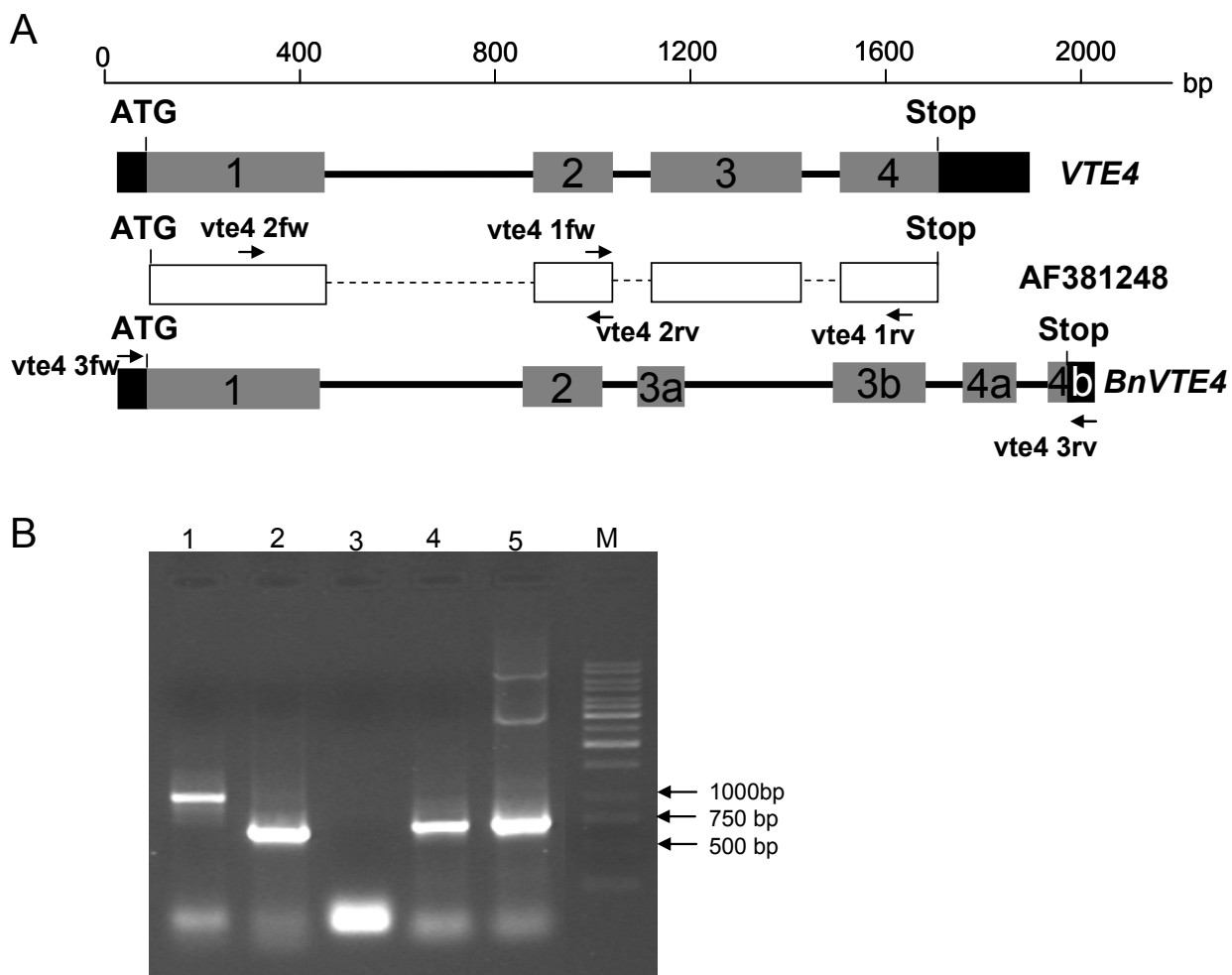


Abbildung 13: Lage und Überprüfung der Primer zur Amplifizierung von *B. napus* Sequenzen mit Homologie zum *A. thaliana* Gen *VTE4*. (A) Schematische Darstellung des *A. thaliana* *VTE4*-Gens und Lage der homologen Sequenz AF381248 (*B. oleracea* EST) sowie der über RACE und genomische Fragmente ermittelten *BnVTE4* Sequenz aus *B. napus*. Pfeile: Primerbindungsstellen; schwarz: nicht translatierte Sequenz, grau: translatierte Sequenz; dünner Balken: nicht transkribierte Sequenz, dicker Balken: transkribierte Sequenz, weißer Kasten: Homologe *Brassica* Sequenz, gestrichelt: keine Sequenzinformation, Ziffer: Exonnummer. (B) Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate aus den PCR-Reaktionen mit den Primerkombinationen *vte4* 1fw / *vte4* 1rv (Spuren 1 und 2) und *vte4* 2fw / *vte4* 2rv (Spuren 4 und 5) in einem 0,8 %igen Gel bei 70 V für 50 Minuten. Spuren 1 und 4: Raps DNA, Spuren 2 und 5: das *AthVTE4* Gen tragendes Plasmid (Klon Nr. 3485), Spur 3: Null-Kontrolle aller vier Primer mit Wasser.

Zur Überprüfung, ob die Primer zur Amplifizierung homologer Fragmente des *VTE4*-Gens aus Raps einsetzbar sind, wurden PCR Reaktionen mit den Primerkombinationen *vte4* 1fw und *vte4* 1rv sowie *vte4* 2fw und *vte4* 2rv durchgeführt. Die erwarteten Amplifikatgrößen mit genomischer Arabidopsis-DNA betragen 665 bp bzw. 738 bp. In Abbildung 13B sind die mit PCR erhaltenen Amplifikate aus Raps- und Arabidopsis-DNA für beide Primerkombinationen vergleichend dargestellt. Für *A. thaliana* wurden Fragmente erwarteter Größe erhalten. Die Auftrennung der Raps-Amplifikate ergab ebenfalls jeweils eine einzelne Bande. Die Primerkombination *vte4* 2fw / *vte4* 2rv ergab ein Fragment von ca. 750 bp (*BnVTE4-750*) das der Größe des Arabidopsisfragments entsprach. Die Primerkombination *vte4* 1fw / *vte4* 1rv ergab mit ca. 1000 bp (*BnVTE4-1000*) ein im Vergleich zu Arabidopsis über 300 bp längeres Fragment.

Das PCR-Produkt *BnVTE4-1000* wurde aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und mittels pGEM® T-Vektor (Abbildung 4) in *E. coli* transformiert. Es wurden vier verschiedene Kolonien gepickt und die DNA extrahiert. Die Plasmide 3486 und 3487 (Tabelle 8) wurden mittels Sp6- bzw. T7-Primer von beiden Richtungen sequenziert. Die Sequenzen wurden in das Programm SeqMan der DNASTAR Lasergene Software (GATC Biotech) eingeladen und analysiert. Die Sequenzen konnten zu einer Konsensussequenz zusammengefügt werden. Im Anhang (Abbildung 32) ist die sich aus den Sequenzierungen ergebene Konsensussequenz im Vergleich zur Arabidopsis Sequenz dargestellt. Die Ergebnisse des Sequenzvergleichs sind in (Tabelle 15) zusammengefasst. Die *BnVTE4-1000* Sequenz hat inkl. der Primersequenzen eine Länge von 1063 bp und ist damit um 398 bp länger als der entsprechende Abschnitt der *A. thaliana VTE4* Sequenz. Die Homologie zur Arabidopsis Sequenz betrug 80 %, wobei die größten Unterschiede in den Intronsequenzen liegen. Der Sequenzvergleich ergab, dass die in *VTE4* bekannten Introns auch in der Rapssequenz zu finden waren. Zusätzlich sind in der Sequenz *BnVTE4-1000* zwei weitere Introns von 318 bp (Position 216 bis 534) und 85 bp (Position 929 bis 1014) Länge identifizierbar (Abbildung 13). Die Identifizierung erfolgte durch Sequenzvergleich zur *BnVTE4*-cDNA Sequenz die in Kapitel 3.2.2.2 beschrieben wird.

Das Fragment *BnVTE4-750* wurde aus genomischer DNA der Rapsorten „Mansholts Hamburger Raps“ und „Samourai“ amplifiziert und mittels pGEM® T-Vektor in *E. coli* transformiert. Einzelne positive Klone wurden in einer Kolonie-PCR-Reaktion mit den Primern SP6/T7 eingesetzt. Es wurden die PCR-Produkte von 24 „Mansholts Hamburger Raps“-Klonen und von 15 „Samourai“-Klonen jeweils aus beiden Richtungen sequenziert (Klon Nr. 3488-3490, Tabelle 8). Die erhaltenen Sequenzen wurden in das Programm SeqMan der DNASTAR Lasergene Software (GATC Biotech) eingeladen und analysiert. Es konnten drei homologe *BnVTE4-750* Sequenzen (a bis c) identifiziert werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 zusammengefasst. Alle drei Sequenzen wurden in beiden Rapsorten gefunden. Die einzelnen Sequenzen haben eine Länge inkl. Primer von 737 bp, 741 bp und 739 bp. In diesem Bereich zeigen sie somit eine Differenz von bis zu zwei Nukleotiden zu der Arabidopsis Sequenz (siehe Sequenzvergleich im Anhang, Abbildung 33). Alle drei Sequenzen zeigen das gleiche Exon/Intronmuster wie die entsprechende Arabidopsis Sequenz. Die Homologie

zwischen den einzelnen *BnVTE4-750* Sequenzen liegt zwischen 94 % und 98 % (Tabelle 15). Die Homologie zu dem entsprechenden Abschnitt des Arabidopsis-Gens beträgt 63 % bis 64 % (Tabelle 15). Auch hier liegen die größten Sequenzunterschiede im Bereich der Intronsequenz (vergl. Anhang, Abbildung 33).

Durch Ableiten von Primern aus den *VTE4* Sequenzen von *A. thaliana* und *B. oleracea* konnten 74 % des kodierenden Bereiches des *A. thaliana VTE4*-Gens abgedeckt werden. Um die fehlenden Sequenzinformationen in 5'- und 3'-Richtung zu identifizieren, wurden 5' und 3' RACE-Reaktionen durchgeführt.

Tabelle 15: Übersicht der hier ermittelten genomischen Sequenzen aus *B. napus* mit Homologie zum *A. thaliana* Gen *VTE4* (*AthVTE4*).

Bezeichnung	KlonNr.	Sequenz (bp)	Beginnt bei <i>AthVTE4</i> Nukleotid Nr ¹	Anzahl der Introns ²	Anzahl der Introns in <i>AthVTE4</i> ³	Homologie zu <i>AthVTE4</i> (%)
<i>BnVTE4-750a</i>	3488	737	219	1	1	63
<i>BnVTE4-750b</i>	3489	741	219	1	1	64
<i>BnVTE4-750c</i>	3490	739	219	1	1	63
<i>BnVTE4-1000</i>	3486/3487	1063	938	4	2	80

¹ Gezählt vom Startkodon der genomischen Sequenz, ² Ermittelt durch Vergleich zur *BnVTE4* cDNA Sequenz, ³ Bezogen auf den von der jeweiligen Bn-Sequenz abgedeckten Bereich

3.2.2.2. Identifikation der *BnVTE4* Vollängensequenz mittels 5' und 3' RACE

Ausgehend von den Teilsequenzen *BnVTE4-750* und *BnVTE4-1000* sollte eine Sequenzverlängerung sowohl in 5'- als auch in 3'-Richtung durchgeführt werden. Hierzu wurde das BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (BD Biosciences) verwendet (vergl. Kapitel 2.6). Als Ausgangsmaterial diente RNA aus Blättern von vier Wochen alten Rapspflanzen. Je 900 ng Gesamt-RNA wurden zur Herstellung von cDNA mit 5'- und 3' Adapttern verwendet (vergl. Kapitel 2.5.11.)

Unter Verwendung der in Tabelle 9 aufgeführten Primer *vte4 1fw* bzw. *vte4 2rv* für die 3' RACE und 5'-RACE wurden die RACE-Reaktionen mit 25 Zyklen bei 68 °C und mit 10 Zyklen bei 67 °C durchgeführt. Es wurden aus beiden RACE-Reaktionen Produkte erhalten (Abbildung 14A). Das längste 5'RACE -Produkt hatte eine Länge von circa 1300 bp. Das längste Produkt der 3'RACE lag bei circa 900 bp, ein weiteres dominantes Produkt der 3'RACE hatte eine Länge von circa 750 bp. Die RACE-Produkte wurden direkt aus dem Reaktionsansatz in den pGEM® T-Vektor ligiert und in *E. coli*

transformiert. Rekombinante Klone wurden mittels PCR mit M13 Primern getestet (Abbildung 14B). Die Plasmide der Klone 3491 bis 3494 der 5'RACE-Reaktion sowie Klon 3495 der 3'RACE-Reaktion wurden aus beiden Richtungen, mit den Primern SP6 bzw. T7 sequenziert (Tabelle 8). Die erhaltenen Sequenzen wurden in das Programm SeqMan der DNASTAR Lasergene Software eingeladen. Die im Bereich der RACE-Primer überlappenden Sequenzen aus der 3'RACE-Reaktion und der 5'RACE-Reaktion konnten zu einer Konsensussequenz von 1097 bp zusammengefügt werden (Abbildung 13A). In dem Bereich, der von mindestens zwei Sequenzen abgedeckt wurde, konnten an drei Positionen Sequenzunterschiede identifiziert werden. Die Sequenzanalyse mit dem Programm EditSeq der DNASTAR Lasergene Software (GATC Biotech) ergab weiterhin, dass die 1097 bp umfassende Sequenz einen offenen Leserahmen von 1047 bp enthält. Dieses entspricht exakt dem kodierenden Bereich des Arabidopsis *VTE4*-Gens (Abbildung 13A). Die über die RACE-Reaktionen gewonnene Sequenzinformation diente zum Ableiten der Primer *vte4* 3fw und *vte4* 3rv (Abbildung 13A und Tabelle 9), die zur Amplifizierung der *BnVTE4*-Volllängensequenz für weitere Analysen dienen sollte.

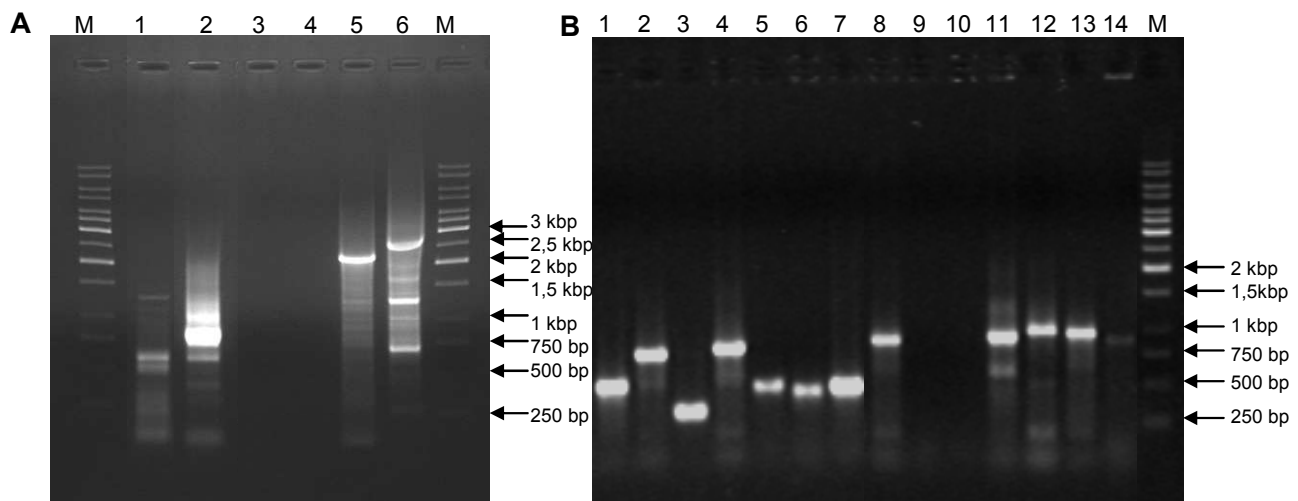


Abbildung 14: 5' und 3' RACE der *BnVTE4* Sequenz. (A) Gelelektrophoretische Auftrennung der 5' und 3' RACE-Produkte erhalten nach der RACE-Reaktion mit 5' und 3' vorbereiteter cDNA aus Rapsblättern unter Verwendung der genspezifischen Primer *vte* 1fw bzw. *vte* 2rv (Tabelle 9) und den Reagenzien aus dem SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (BD Biosciences). Aufgetrennt wurden 20 µl des 50 µl-Ansatzes in einem 0,8 %igen Agarosegel bei 60 V für 1,25 Stunden. Spur 1: 5' VTE4, Spur 2: 3' VTE4, Spur 3: Nullkontrolle (nur genspezifischer Primer), Spur 4: Nullkontrolle (nur mitgelieferter UPM Primer), Spur 5: 5' Positivkontrolle (mitgelieferte TFR-cDNA), Spur 6: 3' Positivkontrolle (mitgelieferte TFR-cDNA), M: kb-Leiter (B) Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte im 1 %igen Agarosegel bei 60 V für 60 Minuten aus der PCR-Reaktion potentiell rekombinanter *E. coli*-Klone mit M13 Primern. Spuren 1 – 7: Plasmid-DNA aus der 5' RACE. Es wurden Fragmente zwischen 400 bp und 1000 bp nachgewiesen, Spuren 8 bis 14: Plasmid-DNA aus der 3' RACE. Aus fünf der sieben getesteten Plasmide konnten Fragmente zwischen 800 und 1000 bp nachgewiesen werden. M: kb-Leiter.

Aufgrund der in Kapitel 3.2.2.1 beschriebenen genomischen *BnVTE4*-Fragmente *BnVTE4*-1000 mit 1063 bp und *BnVTE4*-750 a-c mit 737-741 bp Länge, der aus der RACE-Reaktion erhaltenen Sequenz und der *VTE4* Sequenz von Arabidopsis wurde

erwartet, dass das Amplifikat aus genomischer Raps-DNA eine Länge von circa 2000 bp aufweisen würde. Das Amplifikat aus cDNA sollte eine Länge von circa 1100 bp haben. Abbildung 15 zeigt, dass für genomische *B. napus* DNA und cDNA Fragmente erwarteter Größe erhalten wurden.

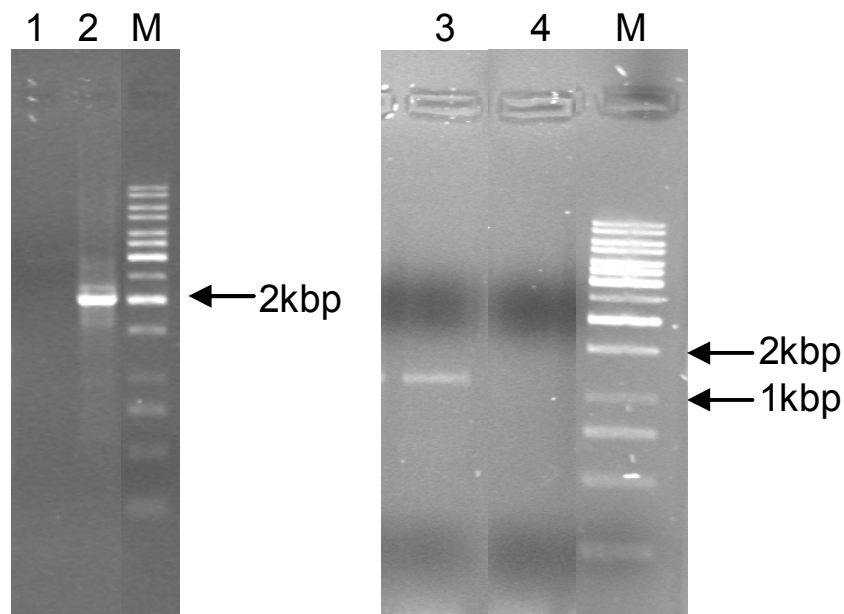


Abbildung 15: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate in einem 1 %igen Agarosegel bei 60 V für 90 bzw. 60 Minuten. Die PCR erfolgte mit den Primern vte4 3fw und vte4 3rv (Tabelle 9). Spur 2: *B. napus* DNA, Spur 3: RT-PCR mit Blatt-RNA (vergl. 2.5.11), Spuren 1 und 4: Null-Kontrollen mit Wasser, M: kb-Leiter

Zur Klonierung der *BnVTE4* Vollängen-Sequenz wurden RT-PCR-Produkte von der Erststrang-cDNA aus Blatt-RNA (synthetisiert mit oligo(dT)-Primern bzw. dem vte4 3fw Primer) amplifiziert. Unter Verwendung des pGEM® T-Vektors wurden diese in *E. coli* transformiert. Über Kolonie-PCR wurde der rekombinante Charakter von 55 pGEM-T_ *BnVTE4* Klonen unter Verwendung der Primer Sp6 und T7 überprüft. Die PCR-Produkte rekombinanter Klone wurden aus beiden Richtungen sequenziert. Von 39 Klonen wurden Sequenzen guter Qualität von mindestens einer Sequenzierichtung erhalten. Diese Sequenzen wurden in das Programm SeqMan der DNASTAR Lasergene Software eingeladen. Bei Einstellung der minimalen prozentualen Übereinstimmung auf 99 % wurden die 4 *contigs* *BnVTE4*-1 bis *BnVTE4*-4 (Klon Nr. 3496 - 3499) erhalten. Die jeweiligen Konsensussequenzen setzen sich aus 24, 8, 4 und 3 Klonen zusammen. Der Vergleich der Einzelsequenzen ist dem Anhang (Abbildung 34) zu entnehmen. Innerhalb der vier *contigs* konnten Einzelnukleotid-Polymorphismen identifiziert werden, die zufällig verteilt in den Sequenzen einzelner Klone vorkamen. Es kamen aber auch Einzelnukleotid-Polymorphismen in mehr als einem Klon vor, die dem Nukleotid einer der anderen *BnVTE4* Sequenzen an dieser Position entsprachen. Wurden die Parameter zur Erstellung der *contigs* auf eine 100 %ige Übereinstimmung der Sequenzen innerhalb eines *contigs* erhöht, wurden insgesamt 20 *contigs* erhalten. Die Zusammensetzung dieser Untergruppen sind im Anhang (Tabelle 26) zusammengefasst.

Der Vergleich der Sequenzen *BnVTE4-1-4* untereinander und mit der kodierenden Sequenz des *A. thaliana* Gens *VTE4* ergab, dass alle vier *BnVTE4* Sequenzen den gesamten kodierenden Bereich des *VTE4*-Gens abdecken und eine hohe Homologie zueinander und zur Arabidopsis Sequenz aufweisen (Tabelle 16). Die Homologien der *BnVTE* Sequenzen zueinander lagen zwischen 97 % und 99 %, die Homologie zwischen den *BnVTE4* Sequenzen und der Arabidopsis Sequenz zwischen 86 % und 87 % (Tabelle 16). Auch die zuvor ermittelte Sequenz (Klon Nr.3491 – 3495) aus der RACE-Reaktion (vergl. Kapitel 3.2.2.1) zeigt eine Homologie von 98 % bis 99 % zu den *BnVTE4* Sequenzen.

Tabelle 16: Homologie zwischen *BnVTE4-1*, *BnVTE4-2*, *BnVTE4-3*, *BnVTE4-4*, der aus der RACE-Reaktion abgeleiteten Sequenz (RACE Kons.) und der *A. thaliana* cDNA. Ermittelt durch Sequenzvergleich mit dem Programm AlignX.

	<i>BnVTE4-2</i>	<i>BnVTE4-3</i>	<i>BnVTE4-4</i>	RACE Kons.	NM_105171
<i>BnVTE4-1</i>	98 %	97 %	97 %	98 %	87 %
<i>BnVTE4-2</i>	--	97 %	98 %	98 %	86 %
<i>BnVTE4-3</i>	--	--	99 %	99 %	86 %
<i>BnVTE4-4</i>	--	--	--	98 %	87 %
RACE	--	--	--	--	87 %

3.2.2.3. Molekulare Charakterisierung der *BnVTE4* Sequenzen

In Kapitel 3.2.2.2 wurde die Identifikation der *B. napus* *VTE4* Homologe *BnVTE4-1* bis *BnVTE4-4* beschrieben. Für die einzelnen Sequenzen konnten mit dem Programm EditSeq der DNASTAR Lasergene Software (GATC Biotech) offene Leserahmen von 1044 bp für die Sequenzen *BnVTE4-1*, *BnVTE4-3* und *BnVTE4-4* und 1047 bp für *BnVTE4-2* ermittelt werden. Die durch Übersetzung dieser ORFs erhaltenen Aminosäuresequenzen sind in Abbildung 16 im Vergleich zu der Sequenz aus Arabidopsis abgebildet. Die Unterschiede zur Arabidopsis Sequenz sind für alle vier Rapssequenzen im Bereich der ersten 50 Aminosäuren am größten. Die Analyse der Aminosäuresequenzen mit dem TargetP1.1 Programm (www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/) ergab, dass dieses der Bereich der Plastidenimport-Sequenz ist. Die Analyse der Aminosäuresequenzen auf konservierte Domänen erfolgte über die pfam-Datenbank (www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/, Sanger-Institute). Die Analyse ergab, dass alle Sequenzen die zu erwartende SAM-abhängige Methyltransferase-Domäne im Bereich der Aminosäuren 130 - 230 zeigen (Abbildung 16).

AthVTE4	(1)	MKATLA	APSSLI	SLPYRT	NSSE	FGSK	SSLL	FRSP	SSSS	VSMT	TTT---	RG	NVA	VA
BnVTE4-1	(1)	MKATLA	APSSLI	SLPRHK	VSSLR	SPSILL	QSQR	PSS--	ALMT	TTT	TA	SR	GS	VAVT
BnVTE4-2	(1)	MKATLA	APSSLI	SLPRHK	VSSLR	SPSILL	QSQR	PSS--	ALMT	TTT	TA	SR	GS	VAVT
BnVTE4-3	(1)	MKATLA	APSSLI	SLPRHK	VSSLR	SPSILL	QSQR	XSS--	ALMT	TTT	TA	SR	GS	VAVT
BnVTE4-4	(1)	MKATLA	APSSLI	SLPRHK	VSSLR	SPSILL	QSQR	XSS--	ALMT	TTT	TA	SR	GS	VAVT
AthVTE4	(52)	AAATS	TEALR	RGIAE	FYNET	SGLWEE	IWGD	HMHG	FYDP	SSVQ	LSDS	SGH	KEA	Q
BnVTE4-1	(52)	AAATSS	FEALR	EGIAE	FYNET	SGLWEE	IWGD	HMHG	FYDP	SSVQ	LSDS	SGH	RE	EAQ
BnVTE4-2	(53)	AAATSS	VEALR	EGIAE	FYNET	SGLWEE	IWGD	HMHG	FYDP	SSVQ	LSDS	SGH	RE	EAQ
BnVTE4-3	(52)	AAATSS	AEALR	EGIAE	FYNET	SGLWEE	IWGD	HMHG	FYDP	SSVQ	LSDS	SGH	RE	EAQ
BnVTE4-4	(52)	AAATSS	AEALR	EGIAE	FYNET	SGLWEE	IWGD	HMHG	FYDP	SSVQ	LSDS	SGH	RE	EAQ
AthVTE4	(106)	IRMIEE	SLRFAG	VTDEE	EE	KKIKK	VVDV	GCGIG	SSRY	LASK	FGAEC	IGIT	LSPV	
BnVTE4-1	(107)	IRMIEE	SLRFAG	VTDEE	EE	KKIKR	VVDV	GCGIG	SSRY	LASK	FGAEC	IGIT	LSPV	
BnVTE4-2	(108)	IRMIEE	SLRFAG	VTDEE	EE	KKIKR	VVDV	GCGIG	SSRY	LASK	FGAEC	IGIT	LSPV	
BnVTE4-3	(107)	IRMIEE	SLRFAG	VTDEE	EE	KKIKR	VVDV	GCGIG	SSRY	LASK	FGAEC	IGIT	LSPV	
BnVTE4-4	(107)	IRMIEE	SLRFAG	VTDEE	EE	KKIKR	VVDV	GCGIG	SSRY	LASK	FGAEC	IGIT	LSPV	
AthVTE4	(161)	QAKRAN	DLA	TAQSL	AHK	SFQVA	DALD	QPFED	GKFD	LVWS	MESG	EHMP	DKAK	FVK
BnVTE4-1	(160)	QAKRAN	DLA	TAQSL	SHKVS	SFQVA	DALE	QPFED	GIFD	LVWS	MESG	EHMP	DKAK	FVK
BnVTE4-2	(161)	QAKRAN	DLA	TAQSL	SHKVS	SFQVA	DALE	QPFED	GIFD	LVWS	MESG	EHMP	DKAK	FVK
BnVTE4-3	(160)	QAKRAN	DLA	TAQSL	SHKVS	SFQVA	DALD	QPFED	GISD	LVWS	MESG	EHMP	DKAK	FVK
BnVTE4-4	(160)	QAKRAN	DLA	TAQSL	SHKVS	SFQVA	DALD	QPFED	GISD	LVWS	MESG	EHMP	DKAK	FVK
AthVTE4	(216)	ELVRV	AAPGG	RIIIV	TWCHR	NLSA	GEEA	LQPWE	QNIL	DKICK	TFYLP	AWC	ST	DY
BnVTE4-1	(215)	ELVRV	AAPGG	RIIIV	TWCHR	NLSP	GEEA	LQPWE	QNIL	LDRI	CKTFY	LP	AWC	STSDY
BnVTE4-2	(216)	ELVRV	AAPGG	RIIIV	TWCHR	NLSA	GEEA	LQPWE	QNIL	LDRI	CKTFY	LP	AWC	STSDY
BnVTE4-3	(215)	ELVRV	AAPGG	RIIIV	TWCHR	NLSA	GEEA	LQPWE	QNIL	LDRI	CKTFY	LP	AWC	STSDY
BnVTE4-4	(215)	ELVRV	AAPGG	RIIIV	TWCHR	NLSA	GEEA	LQPWE	QNIL	LDRI	CKTFY	LP	AWC	STSDY
AthVTE4	(271)	V	LLQS	HSLQ	DIK	CADWS	ENVAP	FWPA	VIRT	ALT	WKGL	VSL	LRSG	MKS
BnVTE4-1	(270)	V	LLQS	HSLQ	DIK	CADWS	ENVAP	FWPA	VIRT	ALT	WKGL	VSL	LRSG	MKS
BnVTE4-2	(271)	V	LLQS	HSLQ	DIK	CADWS	ENVAP	FWPA	VIRT	ALT	WKGL	VSL	LRSG	MKS
BnVTE4-3	(270)	V	LLQS	HSLQ	DIKY	CADWS	ENVAP	FWPA	VIRT	ALT	WKGL	VSL	LRSG	MKS
BnVTE4-4	(270)	V	LLQS	HSLQ	DIKY	CADWS	ENVAP	FWPA	VIRT	ALT	WKGL	VSL	LRSG	MKS
AthVTE4	(326)	PLMIEG	YKKG	VIKFG	IITC	QKPL								
BnVTE4-1	(325)	PLMIEG	YKKG	VIKFG	IITC	QKPL								
BnVTE4-2	(326)	PLMIEG	YKKG	VIKFG	IITC	QKPL								
BnVTE4-3	(325)	PLMIEG	YKKG	VIKFG	IITC	QKPL								
BnVTE4-4	(325)	PLMIEG	YKKG	VIKFG	IITC	QKPL								

Abbildung 16: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von BnVTE4-1, BnVTE4-2, BnVTE4-3 und BnVTE4-4 mit der Sequenz des *A. thaliana* VTE4 Proteins (AthVTE4). Erstellt mit dem AlignX Programm der Vector NTI Software. Schwarz hervorgehoben: identische Aminosäuren, grau hervorgehoben: ähnliche Aminosäuren, die schwarzen und grauen Balken oberhalb der Sequenz markieren den Bereich der Plastidenimport-Sequenz bzw. der Methyltransferase-Domäne.

Zur Einordnung der *BnVTE4* Sequenzen wurden diese mittels AlignX-Analyse der Vector NTI Software (Invitrogen) mit weiteren pflanzlichen cDNA-Sequenzen von *VTE4*-Genen (vergl. Tabelle 14) verglichen. Der sich aus dieser Analyse ergebene phylogenetische Baum ist in Abbildung 17 dargestellt. Aus der Abbildung ist zu erkennen, dass die *BnVTE4* Sequenzen die größte Ähnlichkeit zu anderen *Brassicaceen* Sequenzen aufweisen. *BnVTE4-3* und *-4* zeigen hierbei die größte Ähnlichkeit zu den Sequenzen von *B. juncea*, *B. oleracea* und der zwischenzeitlich veröffentlichten *B. napus* Sequenz der Sorte „Ken C1“ (Tabelle 14).

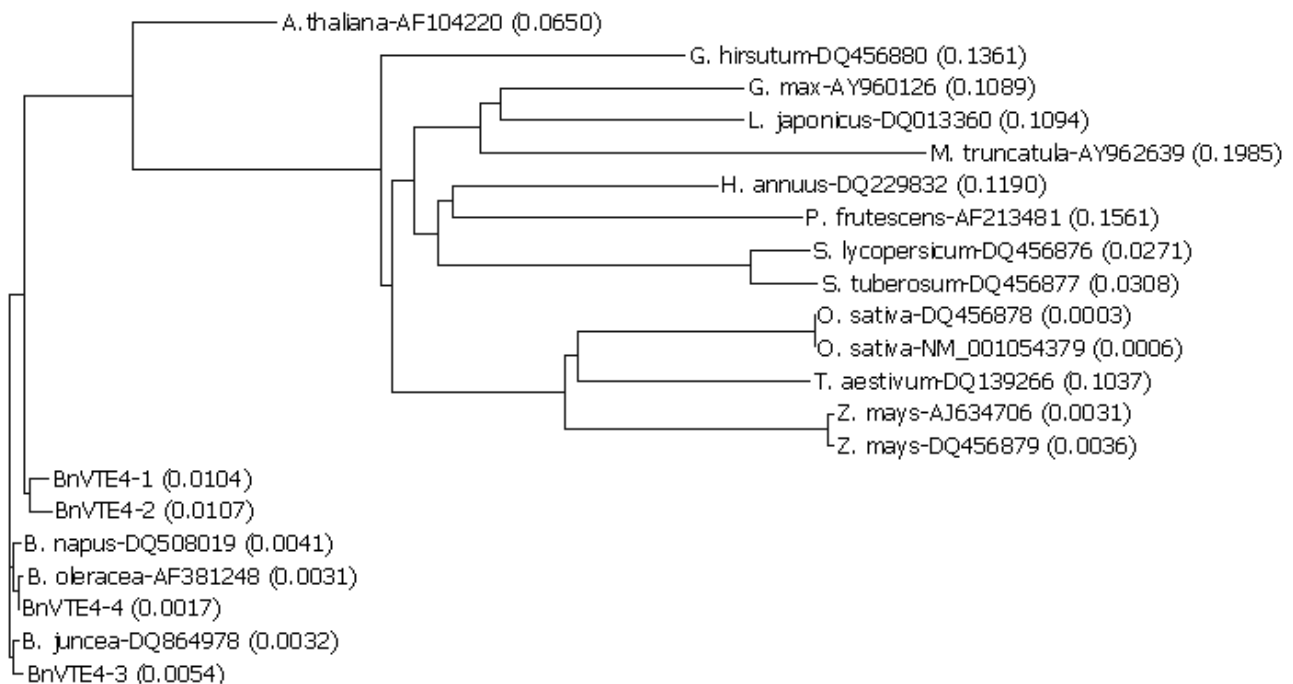


Abbildung 17: Phylogenetischer Baum verschiedener pflanzlicher cDNA Vollängen-Sequenzen (Tabelle 14) mit Homologie zum *VTE4*-Gen sowie der hier klonierten *BnVTE4* Sequenzen. Zur Erstellung wurde das Programm AlignX der Vector NTI Software verwendet. Die Berechnung erfolgte nach der *Neighbor Joining* Methode (NJ). Die berechneten Distanzen stehen in Klammern hinter den Sequenz-Bezeichnungen.

3.2.2.4. Untersuchungen zur Expression der *BnVTE4* Sequenz

Die Isolierung der *BnVTE4*-Vollängen-Sequenzen zeigte bereits, dass die *BnVTE4* Gene im Blattgewebe exprimiert werden, weil zur Klonierung der Sequenzen RNA aus Blättern verwendet wurde (vergl. Kapitel 3.2.2.2). Es wurde eine RT-PCR durchgeführt, um zu überprüfen ob mindestens eines der *BnVTE4* Gene auch in weiteren Geweben exprimiert wird. Des weiteren wurden die identifizierten Sequenzen *BnVTE4-1* bis-4 verwendet und mit *B. napus* ESTs aus öffentlichen Datenbanken verglichen. So sollte die Expression *in silico* nachgewiesen werden, um zu ermitteln in welchen Geweben homologe ESTs identifiziert wurden. Aufgrund der Intron-Exon-Struktur wurde als RT-PCR-Produkt unter Einsatz der Primer *vte4 2fw* und *vte4 2rv* ein 290 bp großes Fragment erwartet (vergl. Abbildung 13A). Das genomische Fragment mit dieser Primerkombination beträgt 740 bp (vergl. Abbildung 13A). Dieser Längenunterschied kann zur Qualitätskontrolle der cDNA herangezogen werden, da bei einer Verunreinigung mit genomischer DNA eine zusätzliche Bande bei 740 bp im Gel sichtbar wäre. In den getesteten Geweben Blatt, Schotenwand und unreifer Samen konnte ein RT-PCR Produkt erwarteter Länge nachgewiesen werden (Abbildung 18). Der Vergleich der in dieser Arbeit identifizierten Sequenzen *BnVTE4-1* bis *BnVTE4-4* mit *B. napus* ESTs aus öffentlichen Datenbanken ist im Anhang (Abbildung 35) dargestellt. Das Ergebnis des Sequenzvergleichs ist in Tabelle 17 zusammengefasst.

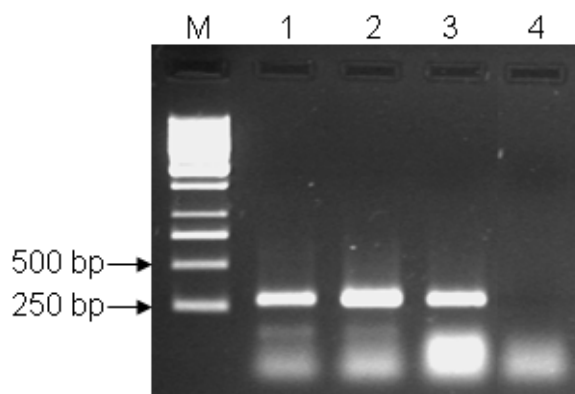


Abbildung 18: Gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR Amplifikate im 1 %igen Agarosegel bei 60 V für 60 Minuten. Die Erststrangsynthese erfolgte aus 0,9 µg bis 1,5 µg Raps-RNA mit oligo(dT)-Primern und dem SuperScript™ First-Strand Synthesis-System (Invitrogen). Die RT-PCR erfolgte mit den Primern *vte4* 2fw und *vte4* 2rv (Tabelle 9). Spur 1: Blatt, Spur 2: Schotenwand, Spur 3: unreife Samen, Spur 4: Null-Kontrolle mit Wasser, M: kB-Leiter.

Die Analyse der ESTs zeigte, dass zusätzlich zu den bereits getesteten Geweben eine Expression auch für Knospen und Blüten gefunden wurde. Die Sequenz CX194597 aus „Express“ zeigt 100 %ige Homologie zur Sequenz *BnVTE4-1*, welche in dieser Arbeit die prominenteste Sequenz aus „Express“ war. Die drei Sequenzen (DQ508019, CD812021 und CD822785) zeigen größere Ähnlichkeit zu den anderen in dieser Arbeit identifizierten *BnVTE4* Sequenzen. Für die Sorte „Jet Neuf“ wurden zwei unterschiedliche Sequenzen gefunden. Im überlappenden Bereich der beiden Sequenzen sind zehn Polymorphismen vorhanden, von denen acht auch zwischen den hier klonierten *BnVTE4* Sequenzen vorkommen. Der Vergleich der ESTs und der hier identifizierten *BnVTE4* Sequenzen mit den genomischen Fragmenten ergab, keinen Hinweis auf mögliche Spleißvarianten.

Tabelle 17: Übersicht der *B. napus* ESTs mit Homologie zum *VTE4* Gen. Die ESTs wurden mittels WU-Blast der *VTE4* Sequenz gegen die Brassica (DNA) Datenbank ermittelt. k.A., keine Angabe

EST	Sorte	Gewebe	Länge (bp)	Beginn bei Nukleotid Nr ¹ .	Homologie zu <i>BnVTE4-x</i> (%)			
					-1	-2	-3	-4
CD812021	Jet Neuf	Samen	402	783	97	98	100	98
CD822785	Jet Neuf	Samen	599	622	97	98	98	100
DQ508019	Ken C1	k.A.	1254	-42	97	97	99	99
CX194597	Express	Blüten und Knospen	708	187	100	97	97	97

¹in Bezug zum Startkodon der *BnVTE4-1* Sequenz

3.2.2.5. Southern-Analyse zur Bestimmung der Kopienzahl von *VTE4*-Homologen im Rapsgenom

Das Gen *VTE4* kommt in Arabidopsis in einer Kopie am Locus At1g64970 vor. Es wurde eine Southern-Analyse mit genomischer Raps-DNA durchgeführt, um abzuschätzen, wie viele Kopien des Gens im Rapsgenom vorkommen. Als Sonde diente ein radioaktiv markiertes *BnVTE4*-1000 Fragment (3.2.2.1). Das Ergebnis der Hybridisierung ist in Abbildung 19 dargestellt. Es wurde in diesem Fall ein Röntgenfilm verwendet, um eine höhere Auflösung zu erhalten.

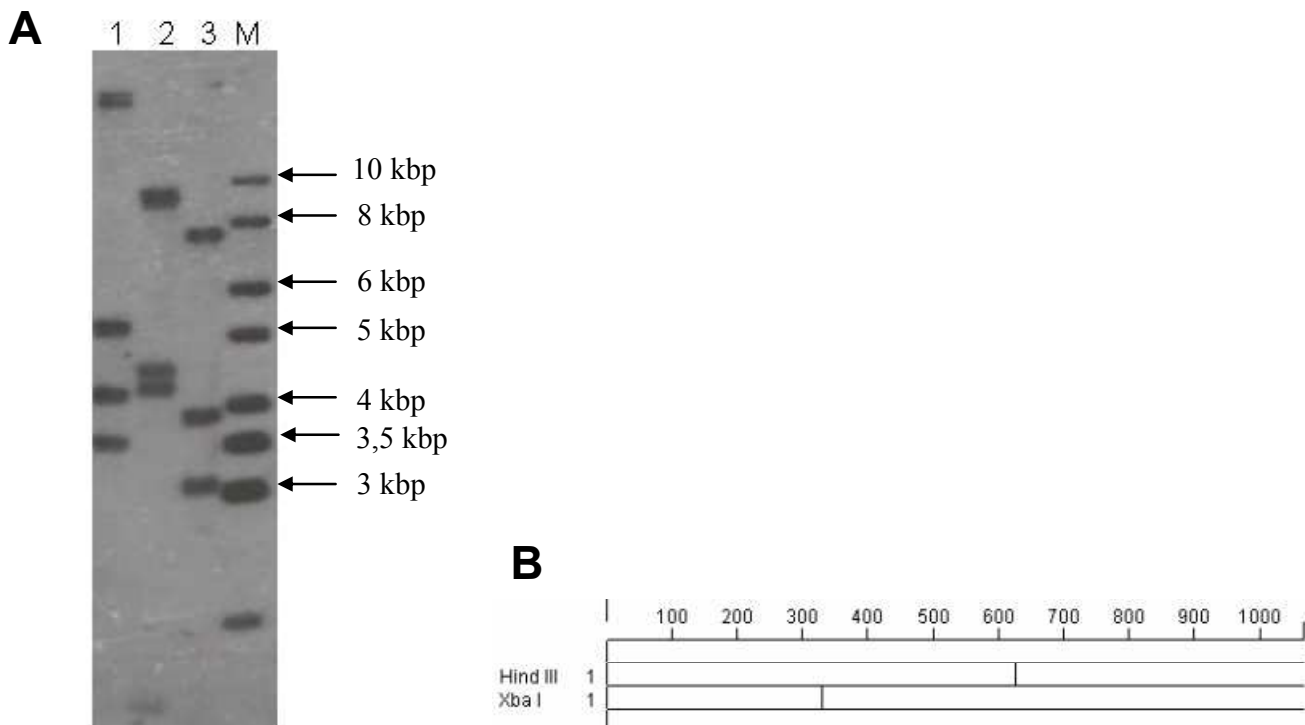


Abbildung 19: Southern-Hybridisierung der Sonde *BnVTE4*-1000 mit genomischer Raps-DNA. (A) Genomische DNA der Sorte „Express“ wurde mit drei Restriktionsendonukleasen verdaut, im Gel separiert, geblottet und mit der radioaktiv markierten Sonde *BnVTE4*-1000 hybridisiert. Die Auswertung erfolgte nach der Exposition des Filters auf einem Röntgenfilm für zwei Tage. Pro Spur sind zwischen drei und fünf Banden zu erkennen. Spur 1: *EcoRI*, Spur 2: *HindIII*, Spur 3: *XbaI*, M: kB-Leiter. (B) Restriktionsstellen im Fragment *BnVTE4*-1000. Die Enzyme *HindIII* und *XbaI* schneiden jeweils einmal. Die Karte wurde mit dem MapDraw Programm der DNASTAR Lasergene Software erstellt.

Abhängig von dem eingesetzten Restriktionsenzym wurden drei bis fünf Fragmente detektiert. Für die Restriktionsenzyme *HindIII* und *XbaI* besteht jeweils eine Schnittstelle innerhalb des *BnVTE4*-1000 Fragments. Für *EcoRI*, für das mit fünf Banden die meisten Fragmente detektiert wurden, konnte keine Schnittstelle in dem als Sonde eingesetzten *BnVTE4*-1000 Fragment gefunden werden. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass eine andere Kopie des Gens im Bereich des *BnVTE4*-1000 Fragments weitere Schnittstellen aufweist. Dass es sich bei den detektierten Fragmenten um Allele eines Locus handelt, kann nahezu ausgeschlossen werden, da die Rapsorte „Express“ eine Liniensorte mit hoher Homozygotie ist. Die in Kap. 3.2.2.2

beschriebenen Sequenzen *BnVTE4-1* bis *BnVTE4-4*, weisen auf die Existenz von mindestens vier *BnVTE4* Loci im Rapsgenom hin.

3.2.2.6. Funktionsanalyse der Sequenz *BnVTE4-1* durch konstitutive Expression in *A. thaliana*

Die in den Kap.3.2.2.2 beschriebenen *BnVTE4* Sequenzen ließen die Annahme zu, dass es sich um Transkripte funktioneller Gene handelte, welche für γ -Tocopherol-Methyltransferasen kodieren. In *A. thaliana* enthalten die Samen durchschnittlich 95 % γ -Tocopherol und 5 % α -Tocopherol. Aus früheren Studien ist bekannt, dass die konstitutive Expression eines *VTE4* Gens in *A. thaliana* zu einer messbaren Verschiebung in der Tocopherolzusammensetzung zu hohen α -Tocopherol-Gehalten führt. Diese Tatsache sollte genutzt werden, um die Funktion einer der *BnVTE4* Sequenzen zu überprüfen.

Aus folgenden Gründen wurde die Sequenz *BnVTE4-1* zur Transformation ausgewählt:

- Die Sequenz zeigt die höchste Homologie zu einem „Express“-EST aus der Genbank (vergl. Tabelle 17).
- Die *BnVTE4-1* Sequenz repräsentiert die höchste Anzahl an Klonen, die zur Identifikation der *BnVTE4* Sequenzen analysiert wurden (vergl. Kapitel 3.2.2.2).
- Die aus dieser Sequenz resultierende Polypeptidsequenz zeigt die höchste Homologie zur Arabidopsis Sequenz (vergl. Abbildung 16).

Die Sequenz *BnVTE4-1* hat eine Länge von 1160 bp. Der Leserahmen von 1044 bp beginnt ab Position 24. Zur Überprüfung der Funktion von *BnVTE4-1* sollte diese Sequenz in *A. thaliana* transformiert werden. Hierzu wurde diese Sequenz in den binären Vektor pAM194 unter der Kontrolle des 35S-Promotors kloniert. Die einzelnen Schritte zur Erstellung und Überprüfung des Konstrukts sind in Abbildung 20A aufgezeigt. Im ersten Schritt diente das Plasmid Nr. 3496 (Tabelle 8) in einer PCR mit den Primern *vte4* Xhofw und *vte4* Xhorv (Tabelle 9) als Matrize. Die Primer waren so modifiziert, dass sie im 5'- und 3'- UTR Bereich der *BnVTE4-1* Sequenz *XhoI* Schnittstellen integrieren (Abbildung 20A). Das so erhaltene Amplifikat wurde erneut in einen pGEM® T-Vektor kloniert und in *E. coli* transformiert. Aus einem mittels blau-weiß-Selektion und PCR-Nachweis als positiv identifizierten Klon (Abbildung 20B) wurde das Plasmid isoliert und über einen *XhoI*-Restriktionsverdau das klonierte *BnVTE4-1* Fragment herausgeschnitten. Dieses *BnVTE4-1-XhoI*-Fragment wurde dann in den ebenfalls mit *XhoI* geschnittenen binären Vektor pAM194 integriert und in *E. coli* zur Vermehrung kloniert.

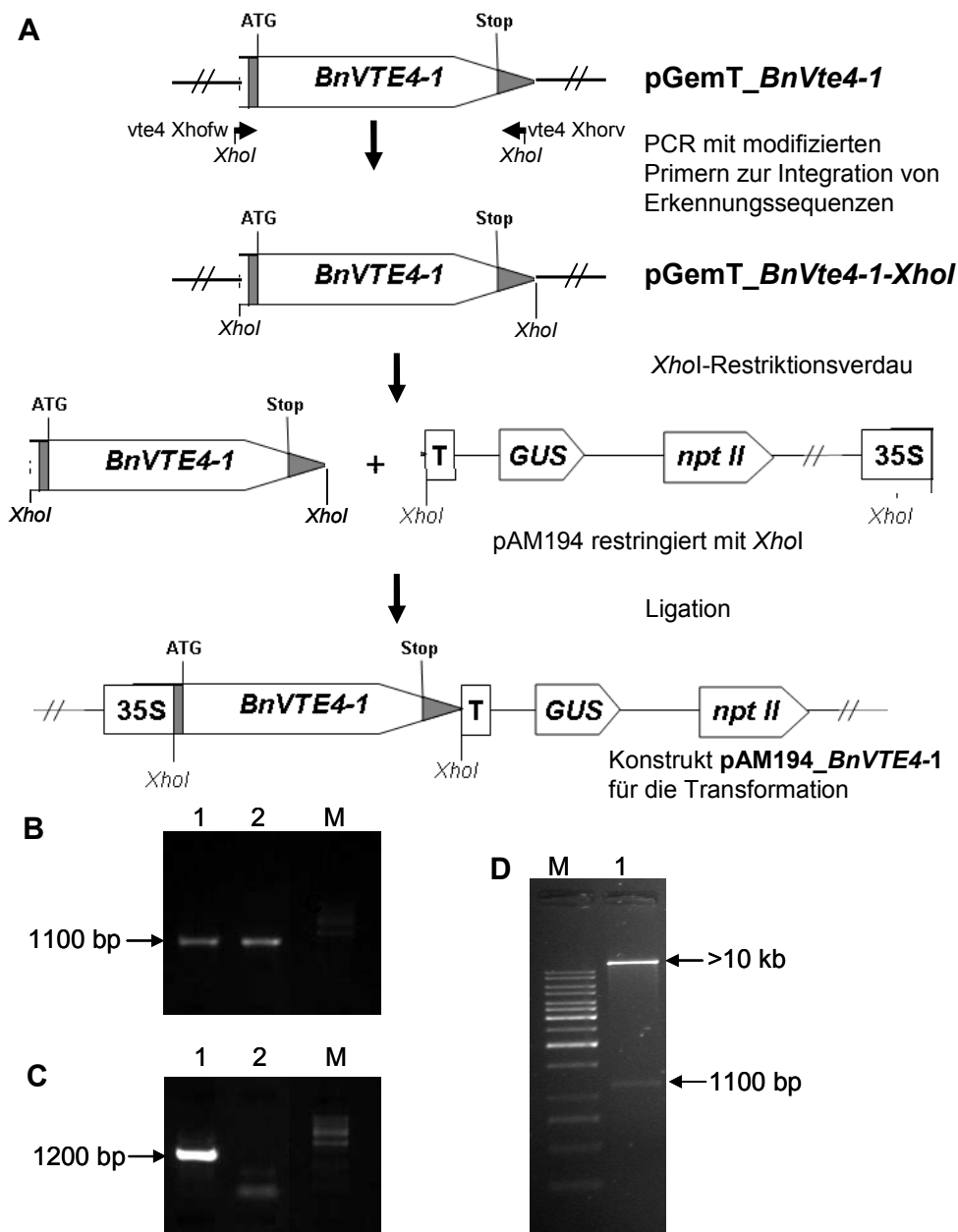


Abbildung 20: Erstellung des Konstrukts pAM194_*BnVTE4-1* (A) Schritte zur Klonierung der *BnVTE4-1* Sequenz in den binären Vektor pAM194. Es wurden *XhoI*-Schnittstellen integriert und diese genutzt, um die Sequenz in den entsprechend vorbereiteten Vektor pAM194 zu ligieren. 35S: 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus, GUS: *GUS*-Gen für die β -Glucuronidase aus *E. coli* unter der Kontrolle des 35S-Promotors als Reportergen, *nptII*: *nptII*-Gen welches Resistenz gegen Kanamycin vermittelt, T: Terminator-Sequenz, grau, nicht-translatierter Sequenzbereich der *BnVTE4-1* Sequenz (B) Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate einer PCR mit den Primern *vte4 xhoI fw* und *vte4 xhoI rv* im 1 %igen Agarosegel bei 70 V für 45 Minuten. Spur 1 und 2: Plasmid-DNA zweier pGemT_*BnVTE4-1-XhoI* Klone zur Überprüfung der inserierten Sequenz. (C) Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate einer PCR mit den Primern 35S fw und *vte4 xhoI rv* im 1 %igen Agarosegel bei 70 V für 45 Minuten zur Überprüfung der Ausrichtung der inserierten Sequenz im pAM194 Vektor. Spur 1: pAM194_*BnVTE4-1* Plasmid welches die *BnVTE4-1* Sequenz in gewünschter Ausrichtung integriert hat, Spur 2: pAM194_*BnVTE4-1* Plasmid welches die *BnVTE4-1* Sequenz nicht in gewünschter Ausrichtung integriert hat. (D) Gelelektrophoretische Auftrennung des pAM194_*BnVTE4-1* Plasmids Nr. 3500 nach *XhoI*-Restriktionsverdau im 0,8% igen Agarosegel bei 60 V für 60 Minuten zur Überprüfung der integrierten *BnVTE4-1* Sequenz. Das Plasmid wurde zur *A. tumefaciens* Transformation verwendet.

Der rekombinante Charakter und die Orientierung der *BnVTE4-1* Sequenz im pAM194-Vektor wurden mittels PCR und Kontrollrestriktion überprüft (Abbildung 20C und D). Das so identifizierte Plasmid 3500 (Tabelle 8) wurde über *A. tumefaciens* vermittelte Wurzeltransformation in *A. thaliana* transformiert (vergl. Kapitel 2.9).

Aus vier Transformationansätzen wurden 30 Sprosse regeneriert. Mittels GUS-Test (vergl. Kapitel 2.9) konnten davon 26 als transgen identifiziert werden. Von drei dieser T0-Pflanzen konnte ausreichend T1 Saatgut für die HPLC-Analyse (vergl. Kapitel 2.10) gewonnen werden. Die stabile Integration des pAM194_ *BnVTE4-1* Konstruktes wurde durch den GUS-Test und eine PCR-Reaktion mit dem 35Sfw und dem *vte4* 1rv Primer überprüft. Die Tocopherolgehalte der Transformanden und der nicht transformierten Kontrollpflanzen sind in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Tocopherolgehalte der Samen von nicht transformierten *A. thaliana* Kontroll-Pflanzen und der *BnVTE4-1*-tragenden Transformanden ermittelt durch HPLC-Analyse. n.n.: nicht nachweisbar

Pflanze	Samen-Tocopherolgehalt (mg/kg)					Konstrukt
	α	β	γ	δ	Summe	
Kontrolle	6	n.n.	415	13	434	---
	7	n.n.	405	16	428	
	8	n.n.	316	9	333	
	8	n.n.	306	9	323	
	6	n.n.	324	11	341	
103	173	2	275	10	460	pAM194_ <i>BnVTE4-1</i>
	177	2	200	8	387	
176	371	7	101	5	484	
	292	5	99	4	400	
90	348	n.n.	9	13	370	

Aus Tabelle 18 ist zu entnehmen, dass der Einfluss der *BnVTE4-1* Sequenz in den transgenen Pflanzen verschieden stark ausgeprägt ist. In Abbildung 21 sind die mittleren Samentocopherolgehalte von transformierten und nicht transformierten Pflanzen vergleichend dargestellt. Mittels t-Test (Signifikanzniveau 1 %) wurde überprüft ob sich die Tocopherolzusammensetzung der Transformanden von den Kontrollpflanzen unterscheidet.

Für den Gesamt-Tocopherolgehalt konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Der α -Tocopherolgehalt war in den Transformanden mit einem mittleren

Gehalt von 272 mg/kg signifikant höher als der Gehalt der Kontrollpflanzen mit 7 mg/kg ($t_{\text{vers}} = 6,36 > t_{\text{Tab}}(4,1\%) = 2,132$). β -Tocopherol konnte nur in den Transformanden nachgewiesen (Mittelwert 3 mg/kg) werden. Der γ -Tocopherolgehalt war im Mittel in den Transformanden mit 137 mg/kg signifikant niedriger als der mittlere Gehalt der Kontrollpflanzen mit 353 mg/kg ($t_{\text{vers}} = 4,2 > t_{\text{Tab}}(4,1\%) = 2,132$). Der δ -Tocopherolgehalt war mit 8 mg/kg in Bezug zu den 11 mg/kg in den Kontrollen ebenfalls reduziert, allerdings nicht signifikant. Die Funktion der *BnVTE4-1* Sequenz konnte somit klar nachgewiesen werden.

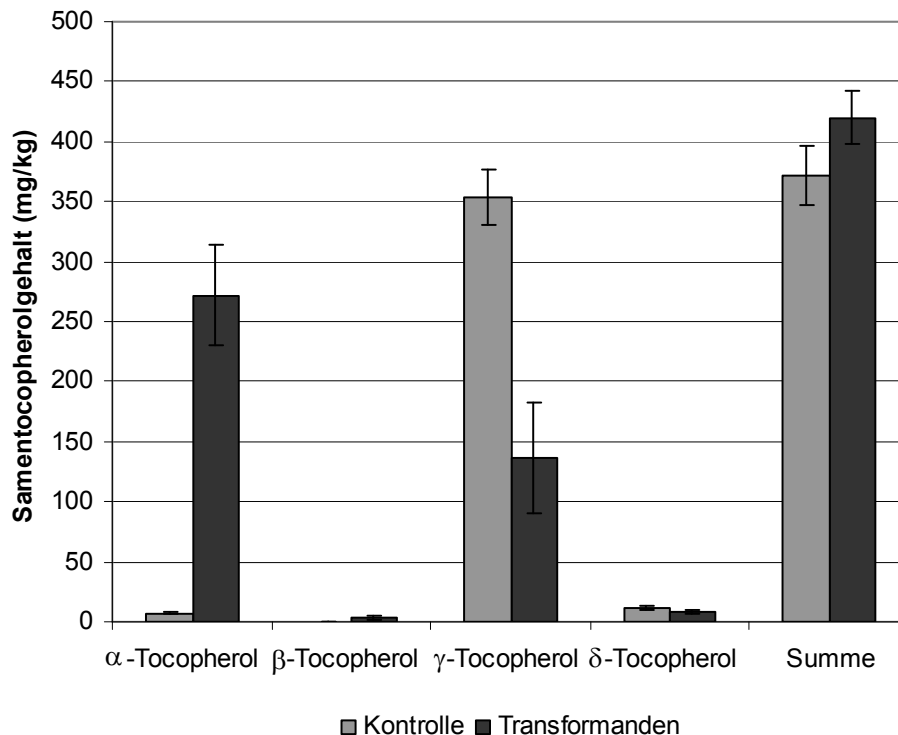


Abbildung 21: Mittlere Tocopherolgehalte und Standardfehler der T1 Samen, die auf drei T0 Pflanzen geerntet worden waren im Vergleich zu untransformierten Kontrollpflanzen. Die Transformanden tragen die *BnVTE4-1* Sequenz unter Kontrolle des 35S Promotors. Der Standardfehler ergibt sich aus fünf Wiederholungen.

3.2.3. Isolierung und Charakterisierung von *B. napus* Sequenzen mit Homologie zum *A. thaliana* Gen *APG1*

Das Gen *APG1* kodiert für die erste Methyltransferase der Tocopherol-Synthese. In diesem Syntheseschritt wird 2-Methyl-6-phytyl-1,4-benzoquinon (MPBQ) in 2,4-Dimethyl-6-phytyl-1,4-benzoquinon umgewandelt (Abbildung 2). Hier spaltet sich der Syntheseweg in den α - und γ -Tocopherol-Zweig bzw. den β - und δ -Tocopherol-Zweig. In öffentlichen Datenbanken sind zehn Vollängen cDNA Sequenzen aus *A. thaliana* hinterlegt. Diese sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Die Sequenz AB054257 zeigt an drei Positionen (77, 146 und 846) Sequenzunterschiede zur Referenzsequenz NM_116206. Die Sequenz AY085864 hat an zwei Positionen und die Sequenz BT025886 an zwei weiteren Positionen abweichende Nukleotide zur Referenzsequenz NM_116206. Die BX-Sequenzen zeigen vereinzelte Sequenzunterschiede, die dadurch erklärt werden können, dass diese Sequenzen unsichere *single-pass-read* Sequenzen sind. Der offene Leserahmen wird übereinstimmend mit 1017 bp angegeben. Das zugehörige Gen *APGI* besteht aus drei Exons getrennt von zwei Introns von 95 bp und 77 bp Länge und kodiert für ein 338 AS umfassendes Polypeptid. Dieses Peptid weist eine Plastidenimportsequenz und eine SAM-abhängige Methyltransferase-Domäne auf. Die Struktur des Gens ist in Abbildung 22A dargestellt.

Tabelle 19: Volllängen cDNA-Sequenzen des *A. thaliana*-Gens *APGI* sowie homologer Sequenzen weiterer Pflanzenarten. Angegeben sind die Akzessionsnummer, das Ausgangsmaterial aus der die Sequenz abgeleitet wurde, die Art und der Ökotyp, das Datum der letzten Aktualisierung des Datenbankeintrags und die in der Datenbank angegebene Länge des Leserahmens. k.A.: keine Angabe

Akzessions-Nummer	Ausgangsmaterial	Ökotyp	letzte Aktualisierung	Leserahmen laut Genbank (bp)
AB054257	mRNA	<i>A. thaliana</i> Columbia	Februar 2004	1017
AY085864	mRNA	<i>A. thaliana</i> Wassilewskija oder Landsberg	Januar 2006	1017
BT025886	mRNA	<i>A. thaliana</i> Columbia	Juni 2006	1017
BX822319	mRNA aus Blüten und Knospen	<i>A. thaliana</i> Columbia	Februar 2004	k.A.
BX822388	mRNA aus Blüten und Knospen	<i>A. thaliana</i> Columbia	Februar 2004	k.A.
BX823122	mRNA aus Blüten und Knospen	<i>A. thaliana</i> Columbia	Februar 2004	k.A.
BX823184	mRNA aus Blüten und Knospen	<i>A. thaliana</i> Columbia	Februar 2004	k.A.
BX823904	mRNA aus Blüten und Knospen	<i>A. thaliana</i> Columbia	Februar 2004	k.A.
BX825577	mRNA aus Blüten und Knospen	<i>A. thaliana</i> Columbia	Februar 2004	k.A.
NM_116206	mRNA	<i>A. thaliana</i> Columbia	Juni 2006	1017
AF162209	mRNA	<i>Lactuca sativa</i>	Dezember 1999	583
AM467254	DNA	<i>Vitis vinifera</i>	Mai 2007	1023
DQ229837	DNA	<i>Helianthus annuus</i>	August 2006	1020
DQ229842	DNA	<i>Helianthus annuus</i>	August 2006	1032
DQ229844	DNA	<i>Helianthus annuus</i>	August 2006	1032
NM_001073806	mRNA	<i>Oryza sativa</i>	Oktober 2006	1047
X56963	mRNA	<i>Spinacia oleracea</i>	April 1991	1035
X94968	mRNA aus Keimlingen	<i>Nicotiana tabacum</i>	Juni 1996	1008

3.2.3.1. Molekulare Charakterisierung der *BnAPG1* Sequenz

Ausgehend von der Sequenzinformation des *A. thaliana APG1* Gens ist es der Gruppe von Prof. J. Meng (National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan, China) gelungen homologe *Brassica sp.* ESTs zu identifizieren, aus denen Primer abgeleitet werden konnten, die zur Amplifizierung der *B. napus* Sequenz *BnAPG1* aus der Sorte „Tapidor“ dienen (vergl. Abbildung 22A). Für die vorliegende Arbeit wurden die Sequenzinformationen der Primer *apg1 fw* und *apg1 rv* dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt. Die Primer sind in Tabelle 9 aufgeführt.

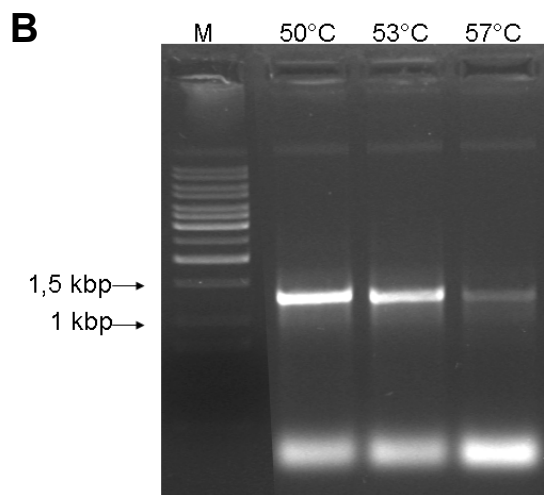
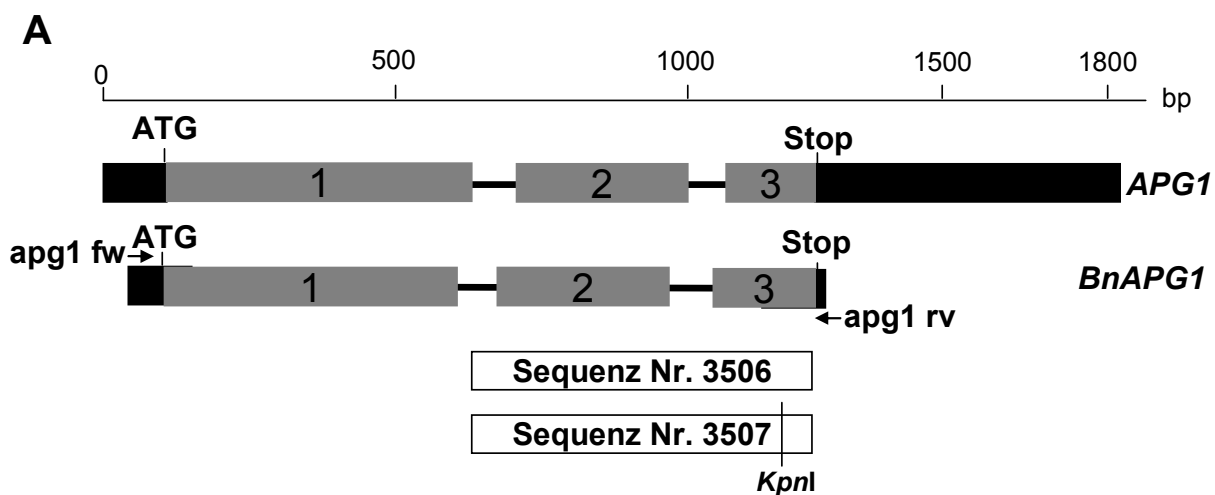


Abbildung 22: Lage und Überprüfung der Primer zur Amplifizierung von *B. napus* Sequenzen mit Homologie zum *A. thaliana APG1* Gen. (A) Schematische Darstellung des *A. thaliana APG1* Gens mit Lage der, genomischen *BnAPG1* Sequenz. Pfeile: Primerbindungsstellen; schwarz: nicht translatierte Sequenz, grau: translatierte Sequenz; dünner Balken: nicht transkribierte Sequenz, dicker Balken: transkribierte Sequenz, Ziffer: Exonnummer, weißer Kasten: die Sequenzen 3506 und 3507 sind partielle genomische *BnAPG1* Fragmente der Sorten „Mansholts Hamburger Raps“ und „Samourai“. Die in 3507 zusätzlich vorhandene *KpnI* Schnittstelle wurde zur Entwicklung eines Markers verwendet (vergl. 3.2.3.4) (B) Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte aus einer Gradienten-PCR mit den Primern *apg1 fw* und *apg1 rv* in einem 1 %igen Agarosegel bei 70 V für 50 Minuten. Als Matrize diente DNA der Sorte „Express“, M: kB-Leiter.

Die Primer wurden aus der Sorte „Tapidor“ abgeleitet. Daher wurde überprüft, ob die Amplifizierung auch in anderen Rapsgenotypen möglich ist. Die erwartete Fragmentgröße für genomische DNA lag bei ca. 1200 bp (Abbildung 22A). Die Gradienten-PCR im Bereich von 50 °C bis 57 °C zeigte, dass die Amplifizierung auch in der Sorte „Express“ möglich ist (Abbildung 22B). Das erhaltene PCR Produkt wurde von beiden Seiten sequenziert und die sich hieraus ergebene Konsensussequenz (*BnAPG1*) der Sorte „Express“ weiter analysiert. Es wurde eine Sequenz inkl. Primersequenz von 1243 bp erhalten. Die Analyse der *BnAPG1* Sequenz mit dem Programm FGESH (www.softberry.com) ergab einen Leserahmen von 1014 bp unterbrochen von zwei Introns mit 78 bp und 90 bp Länge (Abbildung 22A).

Der Vergleich der Sequenz mit der genomischen und der cDNA Sequenz von *A. thaliana* ist im Anhang dargestellt (Abbildung 36). *BnAPG1* zeigt eine 81 %ige Homologie zur genomischen und eine 88 %ige Homologie zur cDNA Sequenz von *APG1* aus Arabidopsis. Die größten Unterschiede liegen im Bereich der Introns.

AtAPG1	(1)	MASLMLNGAITFPKGLGSPG	SNLHARSI	PRPTLLSVTRTSTPRLSVATRCSSSS-
BnAPG1	(1)	MASLMLNGAITFPKGLGF	PASNLHAR--	PSPPLSLVSNATATRLSVATRCSSSSS
AtAPG1	(55)	VSSSRPSAQPRFIQHKKEAYWFYRFLSIVYDHI	INPGHWTE	DMRDDALEPADLSH
BnAPG1	(54)	VSASRPSAQPRFIQHKKEAYWFYRFLSIVYDHI	INPGHWTE	DMRDDALEPADLSH
AtAPG1	(110)	PDMRVVDVGGGTGFTTLGIVKTVKAKNVTILDQSPHQ	LAKAKQKEPLKECKIVEG	
BnAPG1	(109)	PDMRVVDVGGGTGFTTLGIVKTVKAKNVTILDQSPHQ	LAKAKQKEPLKECKIVEG	
AtAPG1	(165)	DAEDLPFPTDYADRYVSAGSIEYWPDPQ	RGIREAYRVLKIGGKA	CLIGPVYPTFW
BnAPG1	(164)	DAEDLPFPTDYADRYVSAGSIEYWPDPQ	RGIREAYRVLKIGGKA	CLIGPVHPTFW
AtAPG1	(220)	LSRFFSDVWMLFPKEEYIEWFKNAGFKDVQLKRIGPKWYRGVRRHGLIMGCSVT		
BnAPG1	(219)	LSRFFADVWMLFPKEEYIEWFKNAGFKDVQLKRIGPKWYRGVRRHGLIMGCSVT		
AtAPG1	(275)	GVKPASGDSPLQLGPKEEDVEKPVNPNPFSFLGRFLLGTLAAAWFVLIPIYMWIKD		
BnAPG1	(274)	GVKPASGDSPLQLGPKEEDVEKPVNPNPFSFLGRFLLGTLAAAWFVLIPIYMWIKD		
AtAPG1	(330)	QIVPKDQPI		
BnAPG1	(329)	QIVPKDQPI		

Abbildung 23: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von BnAPG1 mit der Sequenz des *A. thaliana* APG1 Proteins (AtAPG1), erstellt mit dem AlignX Programm der Vector NTI Software. Schwarz hervorgehoben: identische Aminosäuren, grau hervorgehoben: ähnliche Aminosäuren, die schwarzen und grauen Balken oberhalb der Sequenz markieren den Bereich der Plastidenimportsequenz bzw. der Methyltransferase-Domäne.

Die Übersetzung der Leserahmensequenz mit dem Programm EditSeq (DNASTAR) ergab eine Polypeptidsequenz von 337 AS. Diese zeigte in der Analyse mit dem TargetP1.1 Programm (www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/) die erwartete Plastidenimportsequenz. Über die pfam Datenbank (www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/ Sanger Institute) konnte die erwartete SAM-abhängige Methyltransferase Domäne ermittelt werden (Abbildung 23). Der Vergleich der Arabidopsis- und der Rapssequenz ergab eine Homologie von 98 %. Die größten Unterschiede treten im Bereich der Plastidenimportsequenz auf (Abbildung 23). Im Bereich der Methyltransferase-Domäne gibt es keine Unterschiede.

Der Vergleich der *BnAPG1* Sequenz mit cDNA-Sequenzen anderer Pflanzenarten mit Homologie zum *APG1*-Gen (vergl. Tabelle 19) ist als phylogenetischer Baum in Abbildung 24 dargestellt. Die *B. napus* Sequenz zeigt die größte Ähnlichkeit zur *A. thaliana* Sequenz.

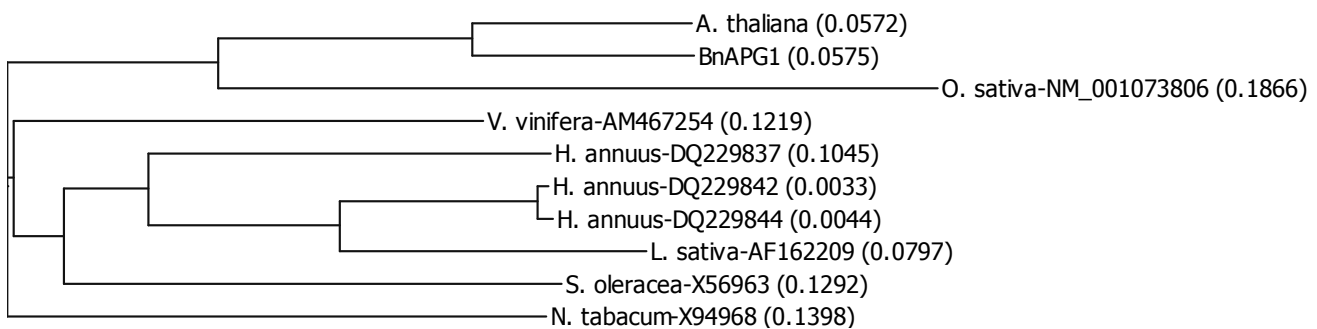


Abbildung 24: Phylogenetischer Baum verschiedener pflanzlicher cDNA Sequenzen (Tabelle 19) mit Homologie zum *APG1*-Gen sowie der hier klonierten Sequenz *BnAPG1*. Zur Erstellung wurde das Programm AlignX der Vector NTI Software verwendet. Die Berechnung erfolgte nach der *Neighbor Joining* Methode (NJ). Die berechneten Distanzen stehen in Klammern hinter den Sequenz-Bezeichnungen.

3.2.3.2. Untersuchungen zur Expression des *BnAPG1* Gens

Es wurde eine RT-PCR durchgeführt, um zu überprüfen, ob das *BnAPG1*-Gen exprimiert wird. Außerdem wurde die identifizierte Sequenz *BnAPG1* mit *B. napus* ESTs aus öffentlichen Datenbanken verglichen, um damit die Expression *in silico* nachzuweisen.

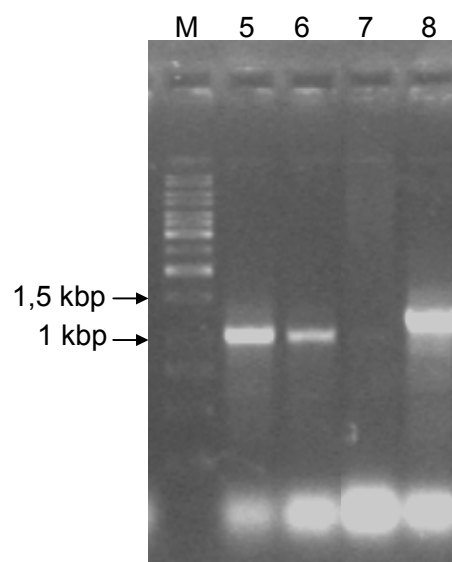


Abbildung 25: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte mit den Primern apg 1fw und apg 1rv (Tabelle 9) im 0,8 %igen Agarosegel für 50 Minuten bei 70 V. Die Erststrangsynthese für die RT-PCR erfolgte aus 0,9 µg bis 1,2 µg Raps RNA mittels oligo(dT)-Primern mit dem SuperScript™ First-Strand Synthesis-System. Spur 1: Samen RNA, Spur 2: Blatt RNA, Spur 3: Nullkontrolle mit Wasser, Spur 4: genomische DNA. M: kB-Leiter

Mit den Primern apg 1fw und apg 1rv wurde ein RT-PCR-Produkt mit einer Größe von 1050 bp erwartet (Abbildung 22). Der Längenunterschied zum genomischen Amplifikat (1243 bp) diene gleichzeitig zur Qualitätskontrolle der cDNA, da bei einer Verunreinigung mit genomischer DNA ein zusätzliches Fragment sichtbar wäre. Sowohl aus Blättern als auch aus Samen konnte ein Fragment erwarteter Größe amplifiziert werden (Abbildung 25).

Der Sequenzvergleich der in dieser Arbeit identifizierten Sequenz mit öffentlichen *B. napus* ESTs ist im Anhang (Abbildung 36) dargestellt. In

Tabelle 20 ist eine Übersicht der ESTs dargestellt. Diese Informationen zeigen, dass eine *BnAPGI* Sequenz neben den bereits mittels RT-PCR überprüften Geweben in Blüten, Knospen und im Embryo exprimiert wird. Die *BnAPGI* Sequenz zeigt an drei Positionen Nukleotidpolymorphismen zu den EST Sequenzen.

Tabelle 20: Übersicht der *B. napus* ESTs mit Homologie zum *APGI* Gen. Ermittelt durch WU-BLAST der *APGI* Sequenz gegen die Brassica (DNA) Datenbank. k.A.: keine Angabe

EST	Sorte	Gewebe	Länge (bp)	Beginn bei Nukleotid Nr. ¹	Homologie zu <i>BnAPGI</i> (%)
CD816416	Jet Neuf	Samen	542	-60	99
CD823316	Jet Neuf	Samen	635	-97	98
CD817192	Jet Neuf	Samen	681	-25	98
CD825789	Jet Neuf	Samen	645	-173	99
CD828005	Jet Neuf	Samen	689	-62	99
CD829552	Jet Neuf	Samen	578	-25	99
CD836346	Jet Neuf	Samen	762	-78	94
CN735033	k.A.	Embryo	662	-83	98
CX187829	Express	Blüten und Knospen	730	417	98
CX187838	Express	Blüten und Knospen	727	417	99
CX187839	Express	Blüten und Knospen	730	417	99
CX188458	Express	Blüten und Knospen	570	-127	99
DY006109	k.A.	Samen	325	389	99

¹ Berechnet vom Startkodon der *BnAPGI* Sequenz

Insgesamt zeigen die ESTs hohe Homologie zueinander. Zwischen den „Jet Neuf“ Sequenzen und zwischen den „Express“ Sequenzen konnten Polymorphismen identifiziert werden. Damit konnten mindestens zwei Versionen der *BnAPG1* Sequenz im Raps-genom identifiziert werden. Der Vergleich der ESTs mit der genomischen *BnAPG1* Sequenz ergab keinen Hinweis auf Spleißvarianten.

3.2.3.3. Southern-Analyse zur Bestimmung der Kopienzahl von *APG1*-Homologen im Raps-genom

Im Arabidopsis-Genom liegt das *APG1* Gen in einer Kopie am Locus At3g63410 vor. Um abzuschätzen, wie viele Kopien des Gens in *B. napus* vorliegen, wurde eine Southern-Analyse durchgeführt. Restringierte *B. napus* DNA wurde mit einem radioaktiv markierten BnAPG1-Fragment (Tabelle 7) hybridisiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 26 dargestellt.

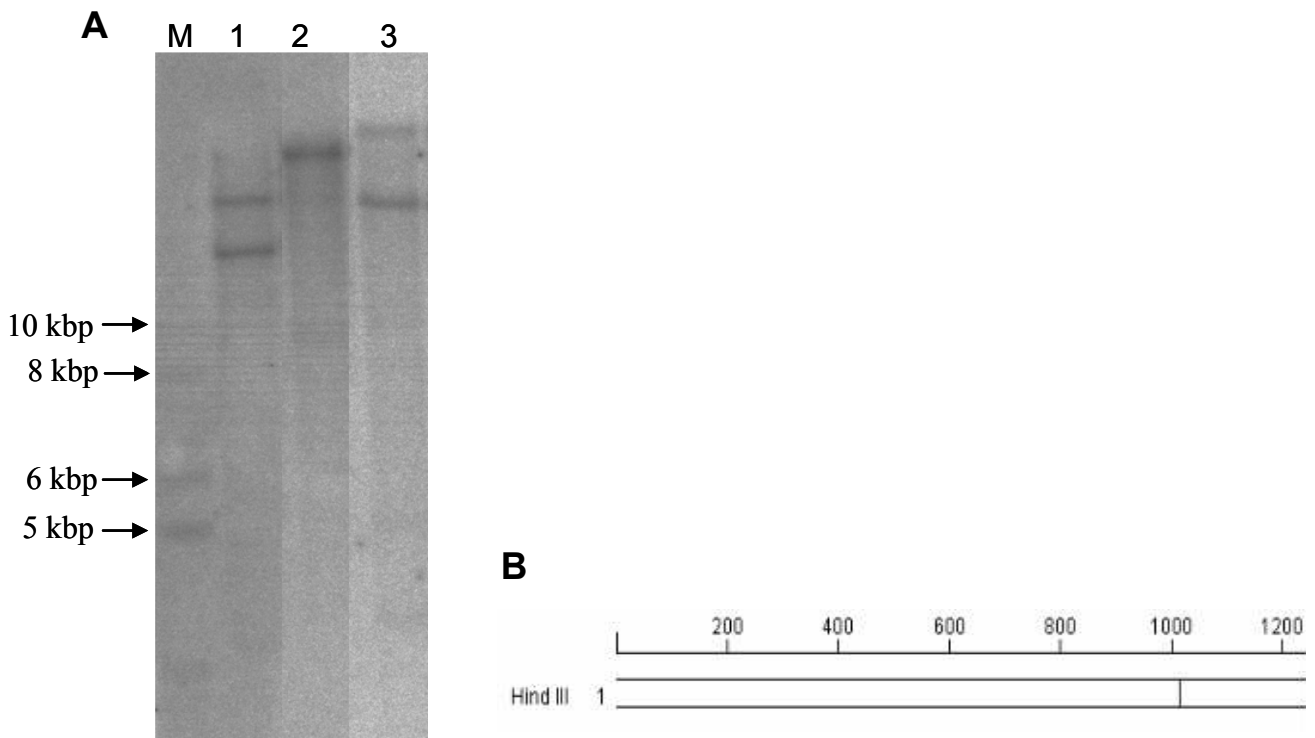


Abbildung 26: Southern-Hybridisierung der Sonde BnAPG1 mit genomischer Raps-DNA. (A) Genomische DNA der Sorte „Express“ wurde mit drei Restriktionsendonukleasen verdaut, im Gel separiert, geblottet und mit der radioaktiv markierten Sonde BnAPG1 (Tabelle 7) hybridisiert. Die Auswertung erfolgte nach der Exposition des Filters auf einer Fotoplatte (eingesehen mit dem FLA5000). Pro Spur sind zwischen einer und zwei Banden zu erkennen. Spur 1: *EcoRI*, Spur 2: *EcoRV*, Spur 3: *HindIII*, M: kB-Leiter (B) Restriktionsstelle im Fragment *BnAPG1*. Das Enzym *HindIII* schneidet einmal. Die Restriktionskarte wurde erstellt mit dem MapDraw Programm der DNASTAR Lasergene Software (GATC Biotech).

Abhängig von dem verwendeten Restriktionsenzym konnten ein oder zwei Fragmente detektiert werden. Innerhalb des als Sonde eingesetzten Fragments lag eine *HindIII*-Schnittstelle vor (Abbildung 26B). Bei der verwendeten Raps-sorte „Express“ handelt es

sich um eine Liniensorte mit einem hohen Homozygotiegrad. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Banden, zwei Loci und nicht Allele eines Locus repräsentieren. Die Analyse der EST Sequenzen (vergl. 3.2.3.2) weist ebenfalls auf das Vorhandensein von zwei Loci hin, während die Analyse der PCR-Amplifikation nur eine Sequenz ergab.

3.2.3.4. Genetische Kartierung der *BnAPG1* Sequenz

Um die Position der in den vorhergehenden Kapiteln beschriebenen Sequenz *BnAPG1* im Rapsgenom zu bestimmen, wurden die Kartierungseltern „Mansholts Hamburger Raps“ und „Samourai“ auf Sequenzunterschiede innerhalb der *BnAPG1* Sequenz untersucht. Es wurden die *BnAPG1*-Fragmente mit den Primern apg 1fw und apg 1rv amplifiziert und mit dem Primer apg 1rv sequenziert. Die erhaltenen 590 bp langen Sequenzen Nr. 3506 und Nr. 3507 (vergl. Abbildung 22A) wurden in das Programm MapDraw der DNASTAR Lasergene Software eingeladen.

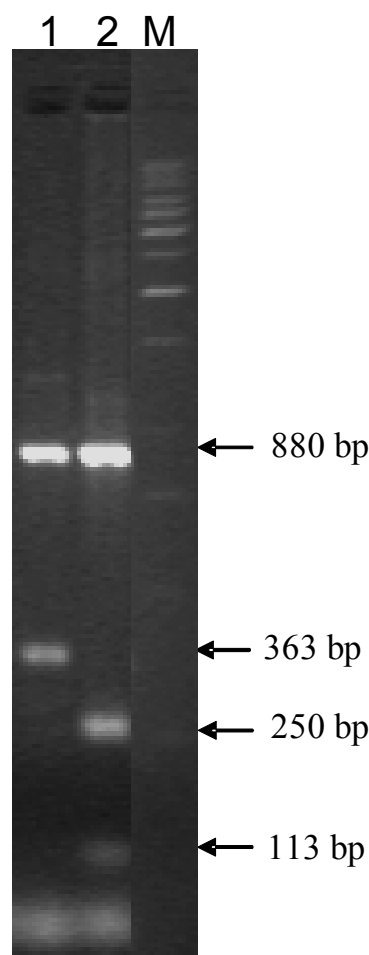


Abbildung 27: Gelelektrophoretische Auftrennung mit *KpnI* restringierter PCR-Amplifikate aus einer PCR mit den Primern apg 1fw und apg 1rv im 2 %igen Agarosegel bei 110 V für 3 Stunden. Spur 1: *BnAPG1*-PCR Produkt aus „Mansholts Hamburger Raps“, Spur 2: *BnAPG1*-PCR Produkt aus „Samourai“

Es wurde jeweils überprüft, welche der zur Verfügung stehenden Restriktionsenzyme in den Sequenzabschnitten schneiden. Die Analyse ergab für das Fragment aus „Mansholts Hamburger Raps“ eine *KpnI* Schnittstelle, während im Fragment aus „Samourai“ zwei Schnittstellen identifiziert wurden. Dieser Sequenzunterschied, der keine Auswirkung auf die resultierenden Aminosäuresequenzen hat, wurde genutzt, um einen CAPS-Marker zu entwickeln. Zur Überprüfung der Nutzbarkeit des gefundenen Polymorphismus wurden *BnAPGI*-PCR-Produkte der Kartierungseltern mit *KpnI* restringiert und im Agarosegel aufgetrennt. Das 1243 bp große Fragment sollte je nach Kartierungselter einmal bzw. zweimal geschnitten werden. In „Mansholts Hamburger Raps“ an Position 851, in „Samourai“ an Position 851 und 1103 (gezählt vom Startkodon). Das erhaltene Restriktionsmuster (Abbildung 27) entsprach den Erwartungen. Somit konnte die Sequenz *BnAPGI* in einen molekularen Marker (*apg1*) umgesetzt werden.

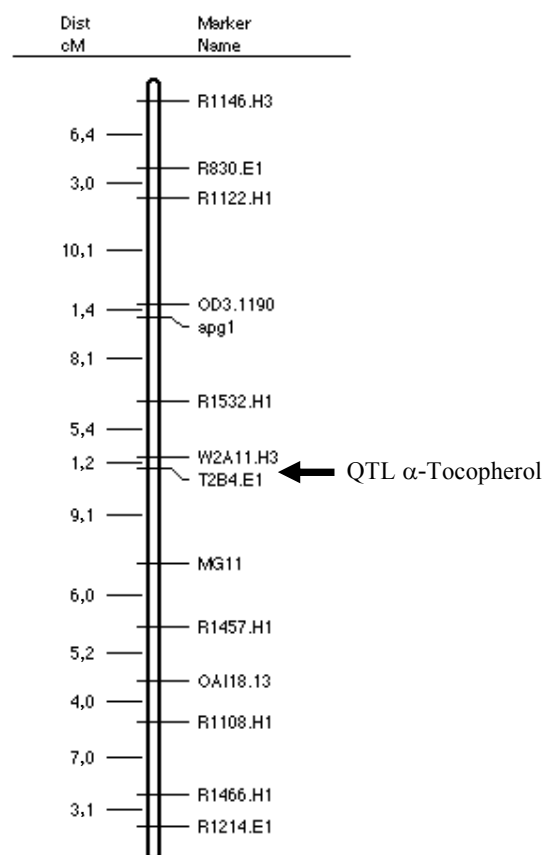


Abbildung 28: Markerkarte der Kopplungsgruppe 3 (entspricht Rapschromosom N07) der Kartierungspopulation „Mansholts Hamburger Raps“ x „Samourai“. Die Karte zeigt die Position des Markers *apg1*, sowie die Position eines früher publizierten QTL für α -Tocopherol-Gehalt. Die Karte wurde unter Verwendung der Kosambi Kartierungsfunktion erstellt.

Der Marker *apg1* wurde nun in die bestehende Kopplungskarte aus der Population „Mansholts Hamburger Raps“ x „Samourai“ integriert. Dazu wurde die DNA von 79 DH-Linien mit dem CAPS-Marker, wie für die Kartierungseltern beschrieben, analysiert. 38 DH-Linien konnten mit dem CAPS Marker dem „Mansholts Hamburger Raps“-Typ zugeordnet werden, 41 Linien konnten dem „Samourai“-Typ zugeordnet

werden. Dieses entspricht dem für eine DH-Population erwarteten Spaltungsverhältnis von 1:1 ($\chi^2 = 0,114 < \chi^2_{\text{Tab}}(1; 5\%) = 3,84$).

Die Daten wurden von Dr. Wolfgang Ecke (Universität Göttingen) dankenswerter Weise mit den bereits aus früheren Arbeiten ermittelten Markerdaten verrechnet. Unter Verwendung der Kosambi-Kartierungsfunktion konnte die Position des Markers *apg1* auf dem Rapschromosom N07 ermittelt werden (Abbildung 28). Der Marker kartiert 1,4 cM vom Marker OD3.1190 und 8,1 cM vom Marker R1532.H1. Der Abstand zu einem früher in dieser Population kartierten QTL für α -Tocopherol-Gehalt (Marwede et al. 2005) beträgt circa 14 cM. Für diesen QTL wurde kein Konfidenzintervall berechnet (W. Ecke pers. Mitteilung).

3.2.3.5. Funktionsanalyse des *BnAPG1*-Gens mittels konstitutiver Expression in *A. thaliana*

Die folgenden Experimente deuteten an, dass es sich bei der *BnAPG1* Sequenz um ein funktionelles Gen handeln könnte:

- Die Sequenzanalyse hat gezeigt, dass Start- und Stoppkodon sowie Spleißstellen vorhanden sind.
- Die RT-PCR hat gezeigt, dass die *BnAPG1* Sequenz exprimiert wird.
- Die sich aus der Translation ergebene Polypeptidsequenz weist Strukturen der zur Funktion nötigen Plastidenimportsequenz und der SAM-abhängigen Methyltransferase-Domäne auf.

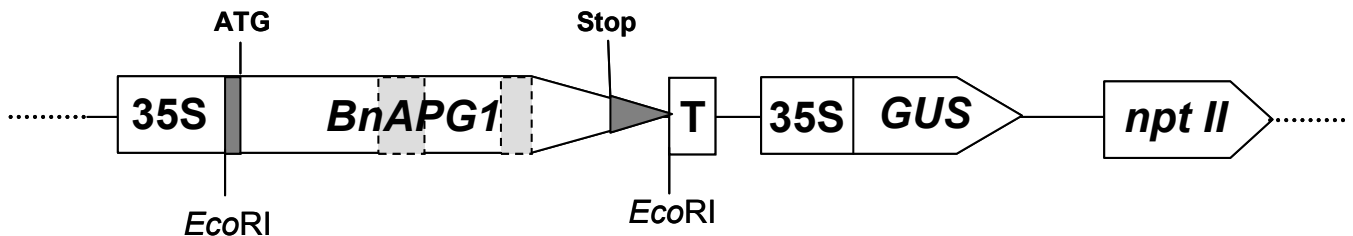
Zur Überprüfung der Funktion wurde das *BnAPG1* Gen in Arabidopsis transformiert und unter Kontrolle des 35S-Promotors exprimiert. Hierzu wurden die Primer *apg1fw* und *apg1rv* um einen *EcoRI*-Adapter verlängert. Fragmente genomischer Raps DNA wurden mit den resultierenden Primern *apg1Ecofw* und *apg1Ecorv* (vergl. Tabelle 9) amplifiziert. Die *EcoRI*-Schnittstellen wurden verwendet, um das *BnAPG1* Gen (analog zu Abbildung 20A), nach einer Zwischenklonierung in den pGEM® T-Vektor, in den binären Vektor pAM194 zu klonieren (Abbildung 29A).

Es wurden 16 Kolonien gepickt. Über PCR mit den Primern *35Sfw* und *apg1rv* und einem *EcoRI* Restriktionsverdau wurde die Integration der *BnAPG1* Sequenz sowie die Ausrichtung in Bezug zum 35S Promotor überprüft. Für die Agrobakterium vermittelte *A. thaliana* Wurzeltransformation wurde das Konstrukt pAM194_ *BnAPG1*-Plasmid Nr. 3502 (Tabelle 8) ausgewählt (Abbildung 29B und C). Dieses enthält die genomische *BnAPG1* Sequenz unter der Kontrolle des 35S-Promotors.

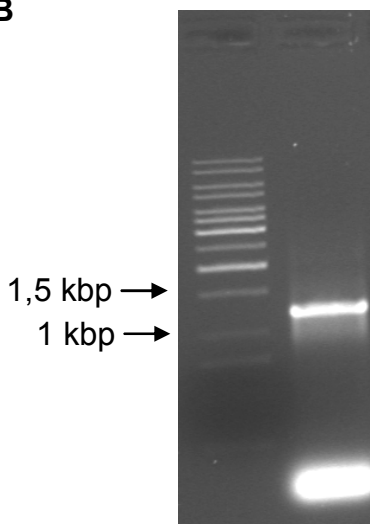
A. thaliana Wildtyp Pflanzen des Ökotyps Columbia wurden verwendet, um über *A. tumefaciens*-vermittelte Wurzeltransformation das pAM194_ *BnAPG1*-Konstrukt zu integrieren (vergl. Kapitel 2.9). Aus zwei Transformations-Experimenten konnten 31

Sprosse regeneriert werden von denen 18 im GUS-Test (vergl. Kapitel 2.9) positiv getestet wurden. Von sechs dieser T0-Pflanzen konnten ausreichend T1 Samen für die HPLC-Analyse (vergl. Kapitel 2.10) geerntet werden. Die transgenen Pflanzen wiesen keine sichtbaren morphologischen Unterschiede zu nicht transformierten Kontrollpflanzen auf.

A



B



C

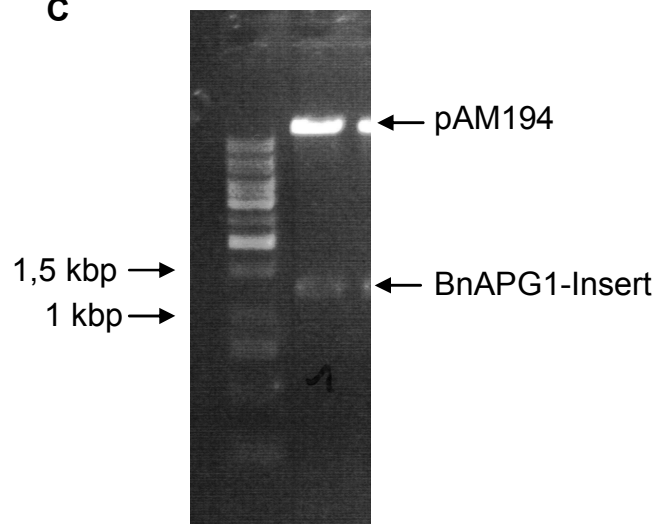


Abbildung 29: Das Konstrukt pAM194_ *BnAPG1*. (A) Schematisches Bild des pAM194_ *BnAPG1* Konstrukts. *EcoRI*: Klonierungsstellen, 35S: 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus, *GUS*: *gus*-Gen für die β -Glucuronidase aus *E. coli* unter der Kontrolle des 35S-Promotors als Reportergen, *nptII*: *nptII*-Gen welches Resistenz gegen Kanamycin vermittelt, T: Terminator-Sequenz, dunkelgrau: 5' und 3' untranslatierter Bereich, hellgrau: Intronsequenz. (B + C) Überprüfung des pAM194_ *BnAPG1*-Plasmids 3502. (B) Gelelektrophoretische Auftrennung des PCR-Produkts von Plasmid 3502 mit den Primern 35S fw und *apg 1rv* im 1 %igen Agarosegel bei 60 V für 60 Minuten zur Überprüfung der Ausrichtung der *BnAPG1* Sequenz. (C) Gelelektrophoretische Auftrennung der *EcoRI* Kontrollrestriktion des Plasmids 3502 im 1 %igen Agarosegel bei 60 V für 60 Minuten.

Durch den GUS-Test und über einen PCR-Nachweis mit den Primern 35S fw und *apg 1rv* konnte die stabile Integration des pAM194_ *BnAPG1* Konstruktes nachgewiesen werden. Aufgrund der vermuteten Funktion der *BnAPG1* Sequenz konnte erwartet werden, dass es zu einer Verschiebung des Tocopherolmusters zugunsten des α - und γ -Tocopherolgehalts bei einer gleichzeitigen Reduktion des δ -Tocopherolgehaltes in transgenen *A. thaliana* Pflanzen kommt. Die Ergebnisse der HPLC-Analyse sind in Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21: Ergebnisse der HPLC-Messung zur Bestimmung der Tocopherolgehalte von T1 Samen der das *BnAPGI-Gen* tragenden Transformanten im Vergleich zu nicht transformierten Kontrollpflanzen.

Pflanze	Samen-Tocopherol-Gehalt (mg/kg)				Konstrukt
	α	γ	δ	Summe	
Kontrolle	6	415	13	434	--
	7	405	16	428	
	8	316	9	333	
	8	306	9	323	
	6	324	11	341	
247	19	405	5	429	pAM194_ <i>BnAPGI</i>
	13	399	10	422	
	12	365	9	386	
117	11	342	4	357	
154	12	419	10	441	
113	12	444	10	466	
188	19	403	10	432	
140b	10	302	10	322	
	7	362	10	379	
	14	348	12	374	

Die mittleren Gehalte der einzelnen Tocopherol-Komponenten sind in Abbildung 30 vergleichend dargestellt. Zur Überprüfung ob sich die Tocopherolzusammensetzung zwischen den Kontrollpflanzen und den transgenen Pflanzen unterschied, wurde jeweils ein t-Test durchgeführt (Signifikanzlevel 1 %). Die untersuchten transgenen Pflanzen zeigten keine signifikanten Unterschiede im Gesamtgehalt und im γ -Tocopherolgehalt. Die Samen der transgenen Pflanzen enthielten im Mittel 400 mg/kg Tocopherol mit 380 mg/kg γ -Tocopherol (Abbildung 30). Der mittlere Tocopherolgehalt der Kontrollpflanzen betrug 370 mg/kg davon 353 mg/kg γ -Tocopherol (Abbildung 30). Der t-Test ergab, dass der α -Tocopherolgehalt in den transgenen Pflanzen im Mittel mit 13 mg/kg gegenüber den Kontrollpflanzen mit 7 mg/kg signifikant erhöht war ($t_{\text{vers}} = 4,68 > t_{\text{Tab}}(4,1\%)$) (Abbildung 30). Der δ -Tocopherolgehalt war in den transgenen Pflanzen mit 9 mg/kg im Mittel niedriger als in den Kontrollpflanzen mit 11 mg/kg (Abbildung 30). Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Die Transformanten

zeigten somit die erwartete Verschiebung im Tocopherolmuster mit einer Reduktion des δ -Tocopherolanteils und einer Erhöhung des α -Tocopherolanteils.

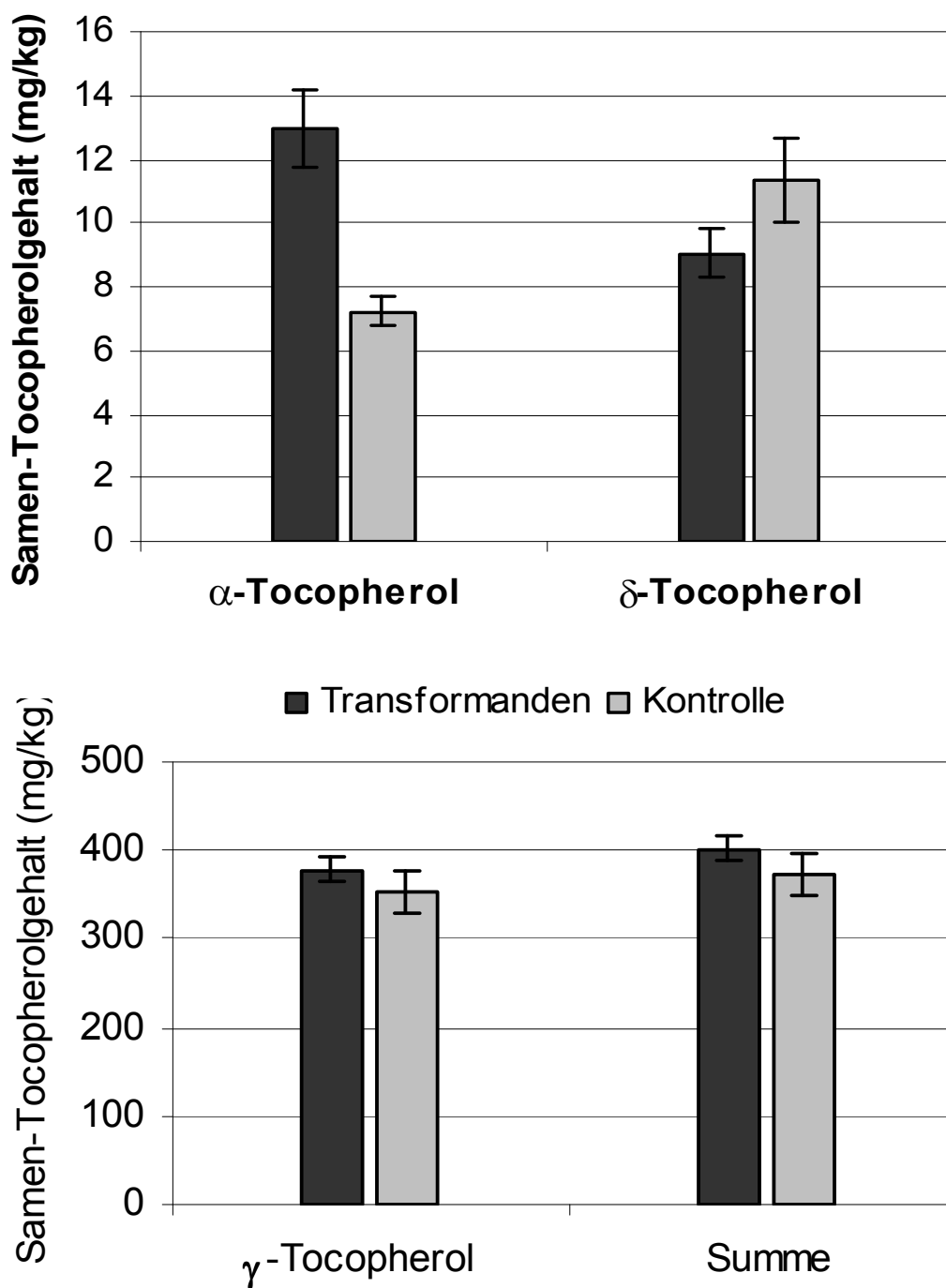


Abbildung 30: Mittlere Tocopherolgehalte und Standardfehler der T1 Samen, die auf sechs T0 Pflanzen geerntet worden waren im Vergleich zu untransformierten Kontrollpflanzen. Die Transformanden tragen die *BnAPGI*-Sequenz unter Kontrolle des 35S Promotors. Der Standardfehler ergibt sich aus zehn Wiederholungen.

4. Diskussion

Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Tocopherolgehalt und damit die Variationsbreite dieses Merkmals in aktuellem Zuchtmaterial zu bestimmen. Da im verwendeten Zuchtmaterial auch Eltern bereits bestehender DH-Populationen vorhanden waren, sollte auf diese Weise auch die Eignung dieser Populationen für eine Kartierung von QTL für den Tocopherolgehalt überprüft werden. Neben der Bestimmung des Tocopherolgehalts sollten Gene der Tocopherolsynthese in Raps kloniert und molekular charakterisiert werden. Diese sollten kartiert werden und über Assoziationsstudien zur Identifikation funktioneller Marker verwendet werden. Die erzielten Ergebnisse sowie weiterführende Strategien werden in den folgenden Kapiteln im Kontext publizierter Arbeiten im Einzelnen diskutiert.

4.1. Vergleichende Bewertung der Tocopherol-Bestimmung von *B. napus*

Die in dieser Arbeit ermittelten Tocopherolgehalte sind in Tabelle 22 im Vergleich zu anderen Studien aufgeführt. Der Tabelle ist zu entnehmen, dass das hier untersuchte Material Herkünfte enthielt, die gegenüber dem bisher beschriebenen Material höhere Tocopherolgehalte aufwiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde aktuelles Zuchtmaterial verwendet, wohingegen bei Goffman und Becker (2002) ältere Sorten und Resyntheseraps untersucht worden sind. Deshalb ist anzunehmen, dass die Erhöhung im Tocopherolgehalt auch den Züchtungsfortschritt durch Selektion auf hohen Tocopherolgehalt widerspiegelt.

Tabelle 22: Übersicht der ermittelten und in der Literatur angegebenen Variationsbreite des Tocopherolgehalts von Rapssamen. k.A.: keine Angabe

Referenz	Anzahl untersuchter Herkünfte	Tocopherolgehalt im Samen (mg/kg)	α -/ γ -Tocopherolgehalt
Appelqvist (1972)	k.A.	136 - 364 ¹	k.A.
Dolde et al. (1999)	9 ²	227 - 312 ¹	0,35 – 0,51
Goffman und Becker (2002)	87 ³	182 - 367	0,36 – 1,23
vorliegende Arbeit	76	198 - 510	0,10 - 0,27

¹ Der Tocopherolgehalt war ursprünglich in ppm in Öl angegeben. Zur Vergleichbarkeit erfolgte eine Umrechnung mit einem angenommenen durchschnittlichen Ölgehalt von 45 %.² Sorten mit genetisch veränderter Ölzusammensetzung, ³ drei-jähriger Versuch: 1 Jahr Gewächshaus, 2 Jahre Feldversuch

Neben den höheren Tocopherolgehalten fällt der Unterschied in den α -/ γ -Tocopherolverhältnissen auf. Die in dieser Arbeit bestimmten Verhältnisse sind deutlich niedriger als bei Goffman und Becker (2002). Das für diese Arbeit verwendete Material wurde, im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Analysen, nicht direkt nach

der Ernte untersucht sondern war bereits für ein bis mehrere Jahre gelagert worden. Aus der Arbeit von Goffman und Möllers (2000) ist bekannt, dass eine Lagerung der Rapssamen bei Temperaturen zwischen 5 °C und 20 °C zwar nicht zu einer Abnahme des Gesamt-Tocopherol-Gehalts führt. Es kommt jedoch zu einer Erhöhung des γ -Tocopherolanteils von circa 20 % nach sechs Monaten. Die von Goffman und Möllers (2000) gemessene Erhöhung im γ -Tocopherolanteil führt zu einer Verschiebung des α -/ γ -Tocopherolverhältnisses. Dieses kann eine Erklärung für die hier gemessenen Werte für das α -/ γ -Tocopherolverhältnis sein. Wie es zu dieser Akkumulation von γ -Tocopherol im ruhenden Samen kommt, ist noch nicht geklärt. Möglich ist, dass bereits vor der Ruhephase des Samens synthetisierte Enzyme eine Restaktivität aufweisen. Die Enzyme der Tocopherolsynthese sind im Samen vorhanden, da die Akkumulation der Tocopherole bis zur Samenreife stattfindet (Goffman et al. 1999a). Das Vorkommen von Enzymtätigkeit im Samen konnten z.B. Zhang et al. (1995a und 1995b) zeigen. In Samen von Reis, Salat, Erbse und Soja konnten sie in Abhängigkeit von der vorherrschenden Luftfeuchtigkeit Enzymaktivitäten (Umsatz von Ethanol und Acetaldehyd) nachweisen. Das hier verwendete Material wurde, wie erwähnt, z. T. bedeutend länger gelagert als das bei Goffman und Möllers (2000) untersuchte Material. Es ist bekannt, dass α -Tocopherol durch oxidative Prozesse stärker beeinflusst wird als die anderen Tocopherole. So können die niedrigen α -/ γ -Tocopherolverhältnisse auch durch Abnahme des α -Tocopherolgehalts erklärt werden. Die Möglichkeit, dass sich der festgestellte Anstieg im Gesamt-Tocopherol-Gehalt lediglich im γ -Tocopherolanteil wiederfindet und damit zu einer Verschiebung führt, lässt sich mit den erzielten Ergebnissen (siehe Anhang, Tabelle 24) nicht bestätigen.

Innerhalb des untersuchten Materials waren die Eltern zweier DH-Populationen enthalten (Saatgut Nr. 070444, 070447, 070450 und 070451), die sich jeweils stark in ihrem Tocopherolgehalt unterschieden (422 mg/kg zu 289 mg/kg und 431 mg/kg zu 286 mg/kg). In einem Feldversuch und anschließender Analyse sollten die dazugehörigen DH-Linien für eine QTL-Analyse phänotypisiert werden. Die Analyse der Tocopherolgehalte der ebenfalls im Feld angebauten DH-Eltern ergab jedoch, dass die zuvor gefundenen Unterschiede nicht mehr nachweisbar waren. Dieses Ergebnis lässt sich durch den hohen Einfluss der Umweltbedingungen auf den Tocopherolgehalt erklären, wie er bereits für Raps beschrieben wurde (Marwede et al. 2004). Das Saatgut der jeweiligen DH-Eltern der ersten Analyse stammte nicht aus dem gleichen Jahr und war damit anderen Umweltbedingungen ausgesetzt. Inzwischen wurde eine Karte mit QTL für Tocopherolgehalt in *B. napus* publiziert (Marwede et al. 2005). Die Population, mit der diese Bestimmung durchgeführt wurde, steht für Analysezwecke zur Verfügung. Aus diesem Grund wurden die Arbeiten zur Identifikation und Analyse einer für das Merkmal Tocopherolgehalt spaltenden Population nicht weiter verfolgt.

4.2. Klonierung von Genen der Tocopherolbiosynthese aus Raps und anderen Arten

Der Tocopherol-Biosyntheseweg wurde Mitte der 1980er Jahre aus Studien mit Cyanobakterien und isolierten Plastiden abgeleitet (Grusak und DellaPenna 1999). Die fünf Gene der direkt an der Synthese beteiligten Enzyme (Abbildung 2) konnten durch Sequenzvergleiche zwischen *Synechocystis* sp. PCC6803 und *A. thaliana* sowie durch Analysen von Mutantenkollektionen für beide Arten identifiziert werden. Die hierzu durchgeführten Arbeiten sind bei DellaPenna und Pogson (2006) zusammenfassend dargestellt. In der vorliegenden Arbeit konnten die *A. thaliana* Sequenzen genutzt werden, um über Sequenzvergleiche mit *Brassica* Sequenzen Konsensusprimer abzuleiten. Als Konsensusprimer wird ein Primer bezeichnet, der zur Amplifikation von homologen Fragmenten aus zwei oder mehr Arten eingesetzt werden kann (Brunel et al. 1999). Die mögliche Nutzung solcher Konsensusprimer zum Vergleich von *B. napus* und *A. thaliana* Sequenzen wurde von Brunel et al. (1999) und von Fourmann et al. (2002) beschrieben, die in ihren Arbeiten Konsensusprimer für Fragmente von sechs bzw. 25 funktionellen *A. thaliana* Sequenzen erstellten. Fourmann et al. (2002) konnten für alle Primerkombinationen homologe Sequenzen aus *A. thaliana*, *B. napus*, *B. oleracea* und *B. rapa* amplifizieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten Konsensusmarker zwischen *A. thaliana* und *B. napus* für die Teilsequenzen *BnVTE4*-750 und *BnVTE4*-1000 sowie für *BnPDS1*-750 erstellt werden. In Übereinstimmung mit Brunel et al. (1999) war es nicht möglich Konsensusprimer abzuleiten, die das gesamte Gen amplifizieren, da die Sequenzen im 5' Bereich der Gene zwischen den beiden Arten stark variieren. Zur Amplifikation der *BnVTE4*, *BnAPG1* und *BnPDS1* Sequenzen wurden daher *brassica*-spezifische Primer verwendet. Brunel et al. (1999) konnten zeigen, dass die sechs von ihnen untersuchten Gene ab Position 75 (gezählt vom Startkodon) jeweils 97 %ige Homologie aufwiesen, während die im 5'-Bereich liegenden Sequenzen stark variierten. In Übereinstimmung mit Brunel et al. (1999) zeigten die in der vorliegenden Arbeit identifizierten Sequenzen von *BnAPG1* und *BnVTE4* in den als Plastiden-Transitpeptid identifizierten Bereichen die größte Variation zu *A. thaliana* (vergl. Abbildung 16 und Abbildung 23). Die in der hier vorliegenden Arbeit bestimmten Homologien der abgeleiteten Peptidsequenzen entsprechen den in der Literatur angegebenen Werten, die zwischen 77 % und 96 % liegen (Cavell et al. 1998).

Die in den Datenbanken hinterlegten Vollängen cDNA Sequenzen für Tocopherol-Gene weiterer Pflanzenarten (vergl. Tabelle 11, Tabelle 14 und Tabelle 19) sind häufig über vorhandene Homologien zugeordnet worden, der Nachweis der Funktion wurde jedoch nicht erbracht. Eine Übersicht an funktionell charakterisierten Genen verschiedener Pflanzenarten ist in Tabelle 23 dargestellt.

Tabelle 23: Übersicht klonierter pflanzlicher Tocopherol-Gene mit nachgewiesener Funktion.

Gen	Art	Funktionsnachweis	Referenz
<i>PDS1</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	Expression in <i>E. coli</i> ; Expression in <i>Nicotiana tabacum</i>	Falk et al. (2002), Kleber-Janke und Krupinska (1997)
	<i>Daucus carota</i>	Expression in <i>E. coli</i>	Garcia et al. (1997)
	<i>A. thaliana</i>	Komplementation der <i>A. thaliana pds1</i> -Mutante	Norris et al. (1998)
<i>VTE1</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Enzymtest nach Expression in <i>E. coli</i> ; RNAi	Hofius et al. (2004)
	<i>A. thaliana</i>	Enzymtest nach Expression in <i>E. coli</i> , Expression in <i>A. thaliana</i>	Porfirova et al. (2002), Sattler et al. (2003), Kanwischer et al. (2005)
	<i>Zea mays</i>	Enzymtest nach Expression in <i>E. coli</i> ; Komplementation der <i>Synechocystis</i> Mutante $\Delta slr1737$	Provencher et al. (2001), Sattler et al. (2003)
<i>VTE2</i>	<i>A. thaliana</i>	Enzymtest nach Expression in <i>E. coli</i>	Collakova und DellaPenna (2001)
<i>APG1</i>	<i>Helianthus annuus</i>	Komplementation der <i>H. annuus</i> Mutante	Tang et al. (2006), Hass et al. (2006)
	<i>A. thaliana</i>	Komplementation der <i>A. thaliana apg1</i> -Mutante; Expression in <i>A. thaliana</i>	Cheng et al. (2003), Van Eenennaam et al. (2003), Motohashi et al. (2003)
<i>VTE4</i>	<i>Helianthus annuus</i>	Kolokalisation mit <i>g</i> -Lokus	Hass et al. (2006)
	<i>A. thaliana</i>	Komplementation der <i>vte4</i> Mutante; Expression in <i>Glycine max</i>	Bergmüller et al. (2003), Van Eenennaam et al. (2003)

Die Funktion potentieller Tocopherol-Gene lässt sich über verschiedene Ansätze ermitteln und hängt von dem jeweiligen Gen ab. Für *PDS1* ist es möglich über heterologe Expression in *E. coli* die Funktion zu überprüfen. Eine funktionelle cDNA Sequenz führt hier zur Akkumulation von Homogentisat, das zu einem braunen Farbstoff oxidiert und polymerisiert (Garcia et al. 1997).

Die in dieser Arbeit identifizierte genomische Sequenz *BnPDS1* konnte nicht mit diesem Testsystem überprüft werden. Da die *B. napus* Sequenz ein Intron trägt, bedingt die Expression in *E. coli* die Verwendung von cDNA. Mit den verwendeten Primerkombinationen konnte jedoch kein Vollängen cDNA Fragment unter den

verschiedenen verwendeten PCR-Bedingungen amplifiziert werden, sondern jeweils nur Teilsequenzen. Durch die Verwendung weiterer Primerkombinationen oder durch Fusionierung von Teilsequenzen wird es zukünftig aber möglich sein, die Funktion der *BnPDS1* Sequenz zu überprüfen.

Die Funktionsanalyse von Sequenzen der weiteren Gene kann z. T. über Enzymtests nach heterologer Expression in *E. coli* erfolgen. Dies bedingt jedoch die Identifikation und Entfernung der Plastiden-Importsequenz. Die Sequenzen können weiterhin in *A. thaliana* oder in einer anderen Pflanzenart exprimiert werden. Dieser Ansatz wurde auch in der vorliegenden Arbeit verfolgt. Zum einen kann der Nachweis durch Komplementation einer Mutante erfolgen (Bergmüller et al. 2003, Cheng et al. 2003, Norris et al. 1998 und Tang et al. 2006). Zum anderen besteht die Möglichkeit den Nachweis über einen veränderten Tocopherolgehalt bzw. eine veränderte Tocopherol-Zusammensetzung zu erbringen (Falk et al. 2003 und Van Eenennaam et al. 2003). Von der Komplementationstudie wurde im Fall von *BnAPG1* Abstand genommen, da die *apg1*-Mutante im homozygoten Zustand letal ist (Cheng et al. 2003). Der Versuch, die *BnVTE4-1* Sequenz über Wurzeltransformation in die *vte4*-Mutanten zu integrieren, ergab 37 regenerierte Sprosse, von denen jedoch keiner das Konstrukt integriert hatte. Die Transformation erfolgte unter denselben Bedingungen wie die Transformation des *A. thaliana* Wildtyps. Da über die Transformation des Wildtyps, transgene Pflanzen regeneriert werden konnten und die *vte4*-Mutante über die *floral-dip* Methode transformierbar ist (Bergmüller et al. 2003), muss angenommen werden, dass die *vte4*-Mutation einen Einfluss auf die Transformierbarkeit über die Wurzel hat.

Die Integration der für die Methyltransferasen kodierenden *B. napus* Sequenzen *BnVTE4* und *BnAPG1*, in den *A. thaliana* (Col)-Wildtyp, führte in beiden Fällen zu signifikanten Veränderungen im Tocopherolmuster. Aufgrund der Funktion der MPBQ-Methyltransferase, für die *APG1* kodiert (vergl. Abbildung 2), wurde eine Erhöhung des γ - und α -Tocopherolanteils bei gleichzeitiger Reduktion des δ -Tocopherolanteils erwartet (Van Eenennaam et al. 2003). Tatsächlich zeigten die Transformanten eine Erhöhung im α -Tocopherolanteil um 100 %. Dieses Ergebnis stimmt mit den von Van Eenennaam et al. (2003) gefundenen Ergebnissen der Überexpression der *APG1* Sequenz in Samen von *Glycine max* überein. Da in *G. max* natürlicherweise größere Mengen an δ -Tocopherol und β -Tocopherol (circa 25 %) vorkommen, ist dort eine messbar höhere zusätzliche Akkumulation von γ -Tocopherol bei gleichzeitiger Reduktion des δ - und β -Tocopherolanteils auf 1 % bis 12 % zu beobachten.

In den Arbeiten von Shintani und DellaPenna (1998) mit *A. thaliana* sowie von Van Eenennaam et al. (2003) mit *G. max* konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *VTE4* in Samen zu einer stark veränderten Tocopherol-Zusammensetzung führt. Die Expression von *VTE4* in *A. thaliana* führte zu einer Erhöhung des α -Tocopherolanteils um 88 % bis 95 % (Shintani und DellaPenna 1998). Die Expression der *A. thaliana* Sequenz in *G. max* führte in T1-Samen zu einem Anstieg des α -Tocopherolanteils um 50 % bis 75 % (Van Eenennaam et al. 2003). Diese Ergebnisse bestätigen die in der vorliegenden Arbeit erzielten Werte. Die bis heute durchgeführten

Analysen stammen aus T1 Samen, die spaltende Familien repräsentieren. Die Arbeiten von Van Eenennaam et al. (2003) und Kanwischer et al. (2005) ergaben, dass einzelne Pflanzen der Folgegenerationen, die in T1-Samen gefundenen Phänotypen deutlich ausgeprägter zeigten. Die von Van Eenennaam et al. (2003) beschriebenen *VTE4/APG1*-Doppeltransformanden zeigten einen erhöhten Tocopherolgehalt mit einem hohen α -Tocopherolanteil. Durch Kreuzung von *BnAPG1*- und *BnVTE4*-Transformanden kann zukünftig ermittelt werden, ob diese beschriebene Steigerung des Tocopherol-Gehalt es auch durch die Raps Gene erzielt werden kann.

4.3. Wie viele Kopien der Tocopherolbiosynthese-Gene liegen im Raps Genom vor?

Für *A. thaliana* ist bekannt, dass die Gene der Tocopherolbiosynthese in jeweils einer Kopie im Genom vorliegen (DellaPenna und Pogson 2006). Synthesestudien zwischen *A. thaliana* und *B. napus* weisen daraufhin, dass eine *single-copy* Sequenz aus *A. thaliana* in sechs Kopien im *B. napus* Genom vorkommt, jeweils drei Kopien aus dem A und C Genom (Cavell et al. 1998, Lagercrantz 1998, Parkin et al. 2002). Diese Ergebnisse beruhen auf Hybridisierungen von *B. napus* DNA mit *A. thaliana* Sequenzen. Fourmann et al. (2002) wählten den PCR basierten Ansatz über *amplified consensus genetic marker* (ACGM), um funktionelle Gene aus *B. napus* in *A. thaliana* und aus *A. thaliana* in *B. napus* zu kartieren. Hierzu verwendeten sie die oben bereits beschriebenen Konsensusprimer. Aus dieser Studie ergab sich, dass für *A. thaliana single-copy* Gene eine bis sieben homologe Kopien im Raps Genom vorlagen. Im Durchschnitt konnten jedoch nicht sechs wie in den Hybridisierungsexperimenten, sondern nur zwei bis vier homologe Sequenzen identifiziert werden. Die Anzahl der in *B. napus* identifizierten Sequenzen entsprach dabei der Summe der aus *B. oleracea* und *B. rapa* amplifizierten Sequenzen.

Auch in der vorliegenden Arbeit führten die PCR- und Southern-Analysen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Für *BnAPG1* konnte über PCR eine Kopie ermittelt werden, wohingegen die Southern-Analysen zusammen mit den EST-Angaben aus der Datenbank auf eine weitere Kopie des Gens im *B. napus* Genom hinweisen. Die Anwesenheit zweier Kopien für *BnAPG1* wird durch ein von Parkin et al. (2005) beschriebenes Ergebnis gestützt. Sie konnten durch Kartierung von *B. napus* Sequenzen in *A. thaliana* feststellen, dass unterschiedliche Bereiche des *A. thaliana* Genoms in verschiedenen Häufigkeiten im Raps Genom vorkommen und dass Chromosom 3, auf dem das *APG1* Gen liegt, unterrepräsentiert ist. Fourmann et al. (2002) konnten in ihrer Studie feststellen, dass 80 % der untersuchten Sequenzen in *A. thaliana* eine gerade Kopienzahl aufwiesen.

Für *BnPDS1* konnten auf genomischer Ebene zwei verschiedene Sequenzen über PCR amplifiziert werden. Die gleichen zwei Sequenzen konnten zur Überprüfung auch in anderen Raps Genotypen identifiziert. Auch die Analyse der ESTs ergab, dass mindestens zwei Kopien des Gens im Raps Genom vorliegen müssen. Dem widersprach

das Ergebnis der Southern Analyse. Diese zeigte, dass bis zu zwei weitere Kopien im Raps-genom vorliegen könnten. Die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Methoden lassen zwei Schlüsse zu. Entweder werden, wie von Fourmann et al. (2002) diskutiert, die Kopienzahlen in Hybridisierungsreaktionen überschätzt oder es werden über PCR nicht alle Kopien erfasst. Durch Sequenzvariationen im 3'-Bereich der Primerbindungsstelle besteht die Möglichkeit, dass PCR-Primer nicht alle Kopien einer Sequenz amplifizieren (Ugozzoli und Wallace 1991), die jedoch mittels Hybridisierung detektiert werden. Andererseits können zusätzliche Hybridisierungssignale durch Reaktionen mit verwandten Sequenzen oder durch Schnittstellen des verwendeten Restriktionsenzym innerhalb der von der Sonde abgedeckten Sequenz verursacht werden.

Für *BnVTE4* wurden widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Kopienzahl im Genom erzielt. Über PCR mit genomischer DNA wurden in zwei unterschiedlichen Genotypen jeweils drei Kopien nachgewiesen. Die Southern Analyse deutete auf drei bis fünf Kopien hin. Wie in Kapitel 3.2.2.2 beschrieben, konnten aus den zur Identifikation der *BnVTE4* Sequenzen analysierten 39 cDNA Klonen vier *contigs* erstellt werden. Innerhalb dieser *contigs* traten jedoch Nukleotidvariationen auf. Diese waren zum Teil Variationen, die sich auf einzelne Nukleotide in einzelnen Klonen beschränkten und durch fehlerhaft eingebaute Nukleotide erklärt werden können. Andere Nukleotidvariationen einzelner Klone kamen mehrfach vor oder wiesen Übereinstimmungen zu einer der anderen Konsensussequenzen auf. Diese Tatsache lässt sich nicht über die Fehlerraten der zur cDNA-Synthese und Amplifikation verwendeten Enzyme erklären. Die Möglichkeit, dass es sich bei den Sequenzvariationen um Sequenzierfehler handelt, kann ausgeschlossen werden. Für keinen der 39 Klone wurden Sequenzunterschiede zwischen den SP6- und den T7-Sequenzen festgestellt. Mögliche Erklärungen für die Sequenzvariationen sind das Vorhandensein weiterer Kopien der *BnVTE4* Sequenz oder posttranskriptionale Modifikation der exprimierten Sequenzen. Der Vergleich der *BnVTE4* Sequenzen mit den genomischen Fragmenten *BnVTE4-750 a-c* und *BnVTE4-1000*, lässt keine Splicevariationen erkennen. Weitere posttranskriptionale Modifikationen, die zu einer Veränderung der Sequenz führen würden, wie das Edieren von RNA ist in Pflanzen nur für plastidäre und mitochondriale Gene beschrieben. Eine endgültige Beantwortung der Frage, wie es zu den gefundenen Sequenzunterschieden kommt, kann mit den vorliegenden Daten nicht getroffen werden und bedarf weiterer Analysen, insbesondere der genomischen Sequenzen. Die Fragmente *BnVTE4-750 a – c* bestätigen auf genomischer Ebene die cDNA Sequenzen *BnVTE4-1* und *-2*, welche sich aus 82 % der sequenzierten Klone zusammensetzen.

Um die genaue Kopienzahl der einzelnen Sequenzen im Raps-genom zu bestimmen, sollte eine Kombination aus Hybridisierungs- und PCR-basierter Methoden angewandt werden. Hierzu sollten die in der vorliegenden Arbeit identifizierten Sonden zum Sichten einer *B. napus* BAC (*bacterial artificial chromosome*)-Bank eingesetzt werden. Identifizierte BAC-Klone können dann mit den beschriebenen Primern analysiert werden. Über Sequenzvergleiche können die einzelnen Kopien identifiziert werden, und dann direkt oder als BAC-Enden in die Rapskarte integriert werden.

4.4. Gene der Tocopherol-Biosynthese als funktionelle Marker für die Grundlagenforschung und für die züchterische Anwendung

Als funktionelle, diagnostische oder perfekte Marker werden molekulare Marker bezeichnet, die direkt an der Ausprägung eines Merkmals beteiligt sind (Bagge et al. 2007). Anders als über Kopplungsanalyse identifizierte Marker anonymer Sequenzen werden in diesem Fall Kandidatengene als Marker eingesetzt.

Das Ziel, identifizierte Gene als molekulare Marker in eine für Raps bestehende Karte zu integrieren, konnte für *BnAPG1* erfolgreich umgesetzt werden. Der Marker *apg1* kartiert auf der Kopplungsgruppe 3, der von Uzunova et al. (1995) für die DH-Population aus „Mansholts Hamburger Raps“ x „Samourai“ erstellten Karte. Diese Kopplungsgruppe konnte zwischenzeitlich durch den Einsatz von SSR (*simple sequence repeats*)-Markern dem Rapschromosom N07 zugeordnet werden (W. Ecke, pers. Mitteilung). In der Arbeit von Parkin et al. (2005) wurde die Genomorganisation zwischen *A. thaliana* und *B. napus* verglichen. Sie verwendeten *B. napus* Sequenzen und kartierten diese durch Sequenzvergleich im *A. thaliana* Genom. Aufgrund der vorliegenden Makrosynthenie konnten Abschnitte des *A. thaliana* Genoms den einzelnen Rapschromosomen zugeordnet werden. Zwar ist es aufgrund fehlender übereinstimmender Marker nicht möglich, die Position des *apg1*-Markers auf die Karte von Parkin et al. (2005) zu übertragen, doch konnte in dieser Karte ein Abschnitt des *A. thaliana* Chromosoms 3, der dem Gen *APG1* (At3g63410) am nächsten liegt, dem Chromosom N07 zugeordnet werden. Die dem RFLP-Marker R1122H1 zu Grunde liegende Sequenz zeigt in der BLASTN Analyse ebenfalls Homologie zu einem intergenischen Bereich des Chromosoms 3 von *A. thaliana*.

Durch Analyse der Population „Mansholts Hamburger Raps“ x „Samourai“ konnten QTL für Tocopherolgehalt und Tocopherolzusammensetzung im Rapsgenom kartiert werden (Marwede et al. 2005). Insgesamt konnten acht QTL auf sechs Kopplungsgruppen identifiziert werden. Da angenommen werden kann, dass die an der Tocopherolsynthese beteiligten Gene einen Einfluss auf den Tocopherolgehalt haben, wurde die Position des *BnAPG1*-Locus mit der Lage der QTL verglichen. Der einzige QTL für den α -Tocopherolgehalt liegt ca. 14 cM unterhalb des *apg1* Markers. Für den QTL wurde kein Konfidenzintervall der Position bestimmt (Marwede et al. 2005, W. Ecke pers. Mitteilung). Da dieser QTL aber nur einen kleinen nicht signifikanten Effekt (aber einen signifikanten Effekt für die QTL x Umweltinteraktion) aufweist, kann man von einem Konfidenzintervall von mehreren 10 cM ausgehen (W. Ecke pers. Mitteilung). Folglich könnte der QTL für α -Tocopherolgehalt mit dem Gen zusammenfallen. Ob das Gen tatsächlich an der Ausprägung der phänotypischen Variation beteiligt ist, könnte durch Analysen weiterer Populationen oder von *near-isogenic-lines* (NILs) untersucht werden.

Die anderen Kandidatengene konnten nicht kartiert werden, da in den analysierten Genabschnitten kein Polymorphismus zwischen den Eltern identifiziert werden konnte. Fourmann et al. (2002) und Brunel et al. (1999) zeigten in den bereits beschriebenen Studien, dass der Einsatz von ACG-Markern eine geeignete Methode zur Kartierung

funktioneller Gene ist. Der Kartierungserfolg hing maßgeblich von den Sequenzunterschieden innerhalb von Intronsequenzen ab, da die kodierenden Sequenzbereiche stark konserviert sind. In *BnPDS1* ist nur ein kurzes Intron vorhanden das, ebenso wie die analysierten Exonbereiche, keine Polymorphismen zwischen den Kartierungseltern von drei Populationen aufwies. Zur Kartierung dieser Gene sollten daher Sequenzinformationen aus den 5'- und 3'-untranslatierten Bereichen herangezogen werden, um hier Polymorphismen zu identifizieren.

Die analysierten *BnVTE4-750*-Fragmente konnten aufgrund der im Genom vorliegenden Kopien nicht direkt sequenziert werden, sondern mussten zuvor kloniert werden. Zwischen den untersuchten Eltern konnten keine Polymorphismen identifiziert werden. Um die einzelnen Kopien getrennt zu untersuchen, sollten wie bei Ugozzoli und Wallace (1991) beschrieben, kopiespezifische Primer abgeleitet werden. Das hätte den Vorteil, dass die unterschiedlichen Kopien getrennt amplifizierbar wären, wie es für die beiden *PDS1* Sequenzen der Fall war. Eine Alternative zur Sequenzierung ist die Auftrennung von PCR-Fragmenten im nicht denaturierenden Polyacrylamidgel (Fourmann et al. 2002), da hier wegen der Trennleistung bereits geringste Größenunterschiede der PCR-Produkte detektierbar sind. Eine weitere Möglichkeit bietet der Einsatz der SSCP –Methode (*single strand conformation polymorphism*), die eine Detektion von Einzelbasenaustauschen und Insertions-/Deletions-Polymorphismen ermöglicht (Orita et al. 1989). Diese Methode konnte z. B. erfolgreich in einer Assoziationsstudie zwischen dem Invertase-Locus und der Kartoffelqualität verwendet werden (Li et al. 2005).

Für den Vergleich der Markerpositionen eines Kandidatengens mit einem kartierten QTL für das entsprechende Merkmal genügt es, einen in der Kartierungspopulation nutzbaren Marker zu Verfügung zu haben. Bei der Entwicklung eines Markers für die Züchtung, ist es jedoch wichtig, dass ein Marker für eine Vielzahl von Genotypen einsetzbar ist. Um funktionelle Marker zu entwickeln, bieten sich *linkage disequilibrium* (LD)-basierende Assoziationsstudien an (Grupta et al. 2005). Zur Identifizierung geeigneter Marker für den Tocopherol-Gehalt und die Tocopherol-Zusammensetzung wird momentan eine Assoziationsstudie mit circa 90 Rapsherkünften aus einer erstellten Kernkollektion (<http://documents.plant.wur.nl/cgn/pgr/brasedb/brasresgen.htm>) unterschiedlicher Herkünfte durchgeführt. Die beschriebenen Gene und weitere *B. napus* Tocopherol-Synthesegene sollen analysiert werden und Genomstrukturen mit den Tocopherolmustern assoziiert werden. Die Untersuchung der Genomstrukturen kann, wie beschrieben, durch direktes Sequenzieren oder eine SSCP-Analyse erfolgen. Außerdem bietet sich die Methode des EcoTILLING an (Comai et al. 2004 und Heinikoff et al. 2004). Beim EcoTILLING erfolgt genau wie beim TILLING (*Targeting Induced Local Lesions in Genomes*), die Hybridisierung eines Referenz-PCR-Produkts mit PCR-Produkten aus Vergleichspools. Die hybridisierten Fragmente werden anschließend über einen *Cell*-Verdau und eine Separation der entstandenen Fragmente im Polyacrylamidgel auf Einzelnukleotid-Polymorphismen untersucht. Die Markerentwicklung erfolgt über die Assoziation von Haplotypen mit dem untersuchten Merkmal, in diesem Fall dem Tocopherolgehalt.

Neben den direkt an der Tocopherolsynthese beteiligten Genen, sollten zur Entwicklung funktioneller Marker auch Gene aus angrenzenden Stoffwechselwegen einbezogen werden. In der von Gilliland et al. (2006) publizierten QTL-Studie zum Tocopherolgehalt in *A. thaliana* konnten 14 QTL identifiziert werden. Für acht der QTL konnten Kandidatengene gefunden werden, die direkt an der Tocopherolsynthese beteiligt sind (*PDS1*, *VTE2* und *VTE4*) oder die über angrenzende Stoffwechselwege die Tocopherolsynthese beeinflussen (*VTE5*, *IPP2*). Auch Valentin et al. (2006) und Venkatesh et al. (2006) konnten durch Analysen von *A. thaliana* Mutanten zeigen, dass Gene aus angrenzenden Stoffwechselwegen den Tocopherolgehalt beeinflussen.

4.5. Perspektiven für die Züchtung von Rapsorten mit veränderten Tocopherolgehalten

Über gentechnische Ansätze konnten Kumar et al. (2005) und Raclaru et al. (2006) den Tocopherolgehalt für Raps in Einzelpflanzen im Vergleich zu Kontrollpflanzen verdreifachen. Sie beschrieben Maximalwerte von 1500 ppm im Öl (dies entspricht circa 670 mg/kg Samen). Diese Ergebnisse zeigen, dass es für Raps physiologisch möglich ist, höhere Tocopherolgehalte im Samen einzulagern. Wie oben beschrieben konnten Van Eenenaam et al. (2003) zeigen, dass die Integration der Gene *APGI* und *VTE4* in Soja zu einer Erhöhung des Gesamt-Tocopherol-Gehaltes bei gleichzeitiger Verschiebung der Tocopherol-Zusammensetzung zugunsten der α -Tocopherol-Fraktion führt. Die hier beschriebenen Sequenzen *BnAPGI* und *BnVTE4* sind folglich interessante Kandidaten, um Raps mit endogen vorkommenden Genen zu transformieren. Zur Expression der Sequenzen im Rapsamen würde sich der ebenfalls aus Raps stammende samenspezifische Napin-Promotor anbieten.

Die klassische züchterische Bearbeitung bedarf zur effizienten Selektion von Pflanzen mit einem gewünschten Merkmal eine kostengünstige, nicht-invasive Hochdurchsatzmethode. Für die Hauptinhaltsstoffe wird für Raps die Nahinfrarot-Spektroskopie (NIRS) eingesetzt. Mit NIRS ist es zwar prinzipiell möglich, den Gesamt-Tocopherol-Gehalt abzuschätzen, doch ist es mit dieser Methode nicht möglich einzelne Tocopherole zu unterscheiden. Daher muss zur Analyse die aufwändige und kostenintensive Methode der HPLC eingesetzt werden. Dabei ist nicht die Halbkornmethode anzuwenden, die zur Bestimmung des Glucosinolatgehalts eingesetzt wird, da bei dieser Methode das notwendige Ankeimen der Samen den Tocopherolgehalt beeinflusst. Trotz fehlender Hochdurchsatzmethoden, konnte über Selektion von Hochtocopherol-Sorten wie unter Kapitel 4.1 diskutiert, in den letzten Jahren ein erheblicher Züchtungsfortschritt beobachtet werden. Es kann daher von einem Züchtungsprogramm mit markergestützter Selektion (MAS) eine weitere deutliche Steigerung des Tocopherolgehalts erwartet werden. Neben der Erhöhung des Gesamt-Tocopherol-Gehaltes sollte es ein Ziel sein, Rapsorten mit anwendungsspezifischen Tocopherol-Zusammensetzungen zu entwickeln. Aus ernährungsphysiologischer Sicht und zur industriellen Gewinnung von natürlichem Vitamin E ist ein Öl mit einem hohen α -Tocopherolanteil erwünscht (Grusak und

DellaPenna 1999). Für die Öl- und Biodieselstabilität werden hohe γ - und δ -Tocopherol-Gehalte bevorzugt

(www.blt.bmlfuw.gv.at/BIOSTAB/download/BIOSTAB_summary_report_web.pdf

Goffman und Möllers 2000). Rocheford et al. (2002) beschreiben eine Strategie zur Verbesserung des Tocopherolgehaltes in Mais. Diese kann im Wesentlichen auf Raps übertragen werden. In der Studie wird neben transgenen Ansätzen, die Möglichkeit des Einsatzes von molekularen Markern diskutiert, die mit QTL assoziiert sind. Rocheford et al. (2002) weisen darauf hin, dass es möglich ist, Allele, die den Gehalt positiv beeinflussen, zu identifizieren und über MAS und gezielte Kreuzungen anzureichern (Pyramidisierung).

5. Zusammenfassung

Raps ist weltweit eine der bedeutendsten Ölpflanzen und stellt eine wichtige Quelle für Vitamin E dar. Als Vitamin E wird die antioxidativ wirkende Gruppe der Tocochromanole bezeichnet, welche aus acht Substanzen besteht. Man unterscheidet die zwei Untergruppen Tocopherol und Tocotrienol, die jeweils in α -, β -, γ -, und δ -Form vorkommen. Rapsöl enthält bis zu 1000 ppm Tocopherol, wobei γ -Tocopherol gefolgt von α - und δ -Tocopherol den größten Anteil ausmacht. Für die menschliche Ernährung hat α -Tocopherol die größte Bedeutung, während für die Ölstabilität γ - und δ -Tocopherol wirksamer sind. Für die Rapszüchtung ergeben sich hieraus als Ziele die Entwicklung von Rapssorten mit gesteigertem Tocopherolgehalt und mit speziellen Tocopherol-Zusammensetzungen. Bis heute konnte die Analyse des Tocopherolgehaltes mit nicht invasiven Methoden, wie der Nahinfrarot-Spektroskopie (NIRS) nicht zuverlässig realisiert werden. Darüber hinaus lässt diese Methode keine Unterscheidung der einzelnen Tocopherole zu. Die Tocopherol-Bestimmung erfolgt daher über die teure und aufwändige HPLC-Analytik. Eine effiziente Methode zur Selektion von Rapssorten würden molekulare Marker bieten. Da angenommen werden kann, dass die an der Tocopherolsynthese beteiligten Gene den Tocopherolgehalt maßgeblich bestimmen, sind diese Sequenzen geeignete Kandidaten, um über Assoziationsstudien und Haplotypenanalyse funktionelle Marker abzuleiten. Unter Kenntnis der Gene, die an der Tocopherolsynthese in *A. thaliana* beteiligt sind, sollten in dieser Arbeit orthologe Gene aus Raps identifiziert werden, um diese als molekulare Marker zu kartieren. Weiter sollte die Position der Gene im Rapsgenom mit bereits kartierten QTL verglichen werden.

Die Untersuchung des Tocopherolgehaltes von 76 Rapsherkünften aus aktuellem Zuchtmaterial ergab eine breite Variation zwischen 198 mg/kg und 510 mg/kg. Über PCR-basierte Methoden ist es gelungen für drei der fünf direkt an der Tocopherolsynthese beteiligten Gene *PDS1*, *APG1* und *VTE4* homologe Sequenzen aus Raps zu klonieren. Die PCR-Ergebnisse und die Southern-Hybridisierungen ergaben, dass die drei Gene in unterschiedlicher Anzahl im Rapsgenom vorliegen. Für *BnAPG1* konnte über PCR eine Sequenz identifiziert werden, für *BnPDS1* zwei und für *BnVTE4* vier Sequenzen. Die Ergebnisse der Southern-Analyse und einer EST-Datenbankrecherche weisen darauf hin, dass für *BnAPG1* eine weitere Kopie im Genom vorkommt. Für *BnPDS1*, *BnAPG1* und *BnVTE4* konnte die Expression nachgewiesen werden. *BnPDS1* und *BnAPG1* haben eine mit den *A. thaliana* Genen identische Intron/Exon-Struktur, wobei sich die Intron-Längen zwischen den beiden Arten unterscheiden. Die *BnVTE4* Sequenzen haben im Vergleich zu *A. thaliana* zwei zusätzliche Introns. Der Vergleich der aus den Leserahmen abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit den jeweiligen *A. thaliana* Sequenzen ergab Homologien von 92 % (*BnPDS1*), 98 % (*BnAPG1*) und 88 % - 90 % (*BnVTE4*). Die Analyse der Aminosäuresequenzen ergab, dass die erwarteten Domänenstrukturen Glyoxalase-/Dioxygenase-Superfamilie (*BnPDS1*) und der SAM-abhängigen Methyltransferasen (*BnAPG1* und *BnVTE4*) vorhanden waren. Durch heterologe Expression von *BnAPG1* und *BnVTE4-1* in *A. thaliana* konnte deren angenommene Funktionen bestätigt werden.

Dazu wurden die Tocopherol-Zusammensetzungen von sechs bzw. drei T1 Familien bestimmt. Für beide Gene konnte ein verändertes Tocopherolmuster in Samen von *A. thaliana* nachgewiesen werden. Die Expression von *BnVTE4-1* führte zu einer Reduktion des γ - und δ -Tocopherol-Anteils bei gleichzeitiger Erhöhung des α - und β -Tocopherol-Anteils. Die Expression von *BnAPG1* führte zu einer Erhöhung des α -Tocopherol-Anteils bei gleichzeitiger Reduktion des δ -Tocopherol-Anteils. Die Sequenz *BnAPG1* konnte darüber hinaus im Abstand von 14 cM zu einem kartierten QTL für α -Tocopherol auf Chromosom N07 lokalisiert werden.

In dieser Arbeit werden zum ersten Mal funktionelle Gene für die Tocopherolsynthese aus Raps beschrieben. Diese können nun verwendet werden, um eine für *B. napus* erstellte Kernkollektion zu untersuchen. Über Assoziationen zwischen Haplotypen und Tocopherol-Phänotypen sollen, den Tocopherolgehalt beeinflussende, Allele identifiziert werden, die als funktionelle Marker in der Züchtung eingesetzt werden können.

6. Summary

Oilseed rape is a major crop for plant oil production and therefore an important source for vitamin E. The term vitamin E (chemically named tocopherol) covers a group of eight antioxidants, four tocopherols and four tocotrienols. Each group harbours a α -, β -, γ - and δ -form. Rapeseed oil contains up to 1000 ppm tocopherol, with γ -tocopherol being the major component, followed by α - and δ -tocopherol. For human nutrition α -tocopherol is the most important form but for oil-stability high amounts of γ - and δ -tocopherol are needed. Thus rapeseed cultivars with increased tocopherol content or with altered seed tocopherol composition are desired. Until now there is no reliable non-invasive method available for tocopherol measurement like near-infrared spectroscopy (NIRS). Additionally this technology is not applicable to differentiate the tocopherol components. Hence the seed tocopherol content has to be determined by HPLC-analysis which is laborious and expensive. For selection, a marker-assisted strategy is supposed to be an efficient method. This work was based on the hypothesis that the genes involved in the tocopherol synthesis directly influence tocopherol composition and accumulation. They are therefore promising candidates for the development of functional markers which can be used for QTL mapping and association studies. In this study, the sequence information of known tocopherol genes from *A. thaliana* was used to clone and characterize putatively orthologous genes from *B. napus*. Furthermore the *B. napus* sequences were mapped and compared to previously mapped QTL.

A panel of 76 rapeseed varieties was analyzed for their tocopherol content. A broad variation ranging from 198 mg/kg to 510 mg/kg seed tocopherol was found. PCR-based methods have been successfully used to clone homologous sequences of *PDS1*, *APG1* and *VTE4* from *B. napus*. The PCR-results and the Southern analysis showed that the three genes have different copy numbers in the *B. napus* genome. The copy numbers determined by PCR, for *BnAPG1*, *BnPDS1* and *BnVTE4* were one, two and four copies, respectively. Southern as well as EST analysis indicated the existence of one more copy for *BnAPG1*. For each of the *B. napus* tocopherol genes identified, the expression could be demonstrated. The comparison with the *A. thaliana* sequences showed in principal the same intron/exon structure for *BnPDS1* and *BnAPG1*, whereas the *BnVTE4* sequences contain two additional introns. The putative amino acid sequences showed 92 % (*BnPDS1*), 98 % (*BnAPG1*) and 88 % - 90 % homology to the respective *A. thaliana* sequences. The analysis of the amino acid sequences revealed the expected domain structures, which are a glyoxylase-/dioxygenase-superfamily domain for *BnPDS1* and SAM-dependent methyltransferase domains for *BnAPG1* and *BnVTE4*. The expected function of these genes was proven by heterologous expression of *BnVTE4-1* and *BnAPG1* in *A. thaliana*. The *BnVTE4-1* and *BnAPG1* were transformed into *A. thaliana* using an *A. tumefaciens* mediated root transformation method. Seeds were harvested from three *BnVTE4-1* T0 plants and from six *BnAPG1* T0 plants, representing nine independent transformation events. The tocopherol composition was determined by HPLC-analysis with seeds harvest from T0-Plants (T1 generation). Both genes led to an altered tocopherol composition in *A. thaliana* seeds. *BnVTE4-1* caused an increase in the α -tocopherol fraction with a simultaneous decrease in the γ -

tocopherol fraction. *BnAPGI* led to higher amounts of α -tocopherol and lower δ -tocopherol contents. Using a previously described mapping population where tocopherol QTL had been mapped, the map position of the *BnAPGI* was determined. As a result, *the BnAPGI* gene had been mapped to chromosome N07, 14 cM above a previously mapped QTL for α -tocopherol.

7. Literaturverzeichnis

Appelqvist, L.-A. O. R., 1972: Rapeseed. Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York.

Arumuganathan, K. and Earle, E., 1991: Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* **9**, 208-218.

Bagge, M., Xia, X., and Luebberstedt, T., 2007: Functional markers in wheat. *Curr.Opin.Plant Biol.* **10**, 211-216.

Becker, H. C., Damgaard, C., and Karlsson, B., 1992: Environmental variation for outcrossing rate in rapeseed (*Brassica napus*). *TAG* **84**, 303-306.

Bergmüller, E., Porfirova, S., and Dörmann, P., 2003: Characterization of an *Arabidopsis* mutant deficient in γ -tocopherolmethyltransferase. *Plant Molecular Biology* **52**, 1181-1190.

Brigelius-Flohe, R. and Traber, M. G., 1999: Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J.* **13**, 1145-1155.

Brunel, D., Froger, N., and Pelletier, G., 1999: Development of amplified consensus genetic markers (ACGM) in *Brassica napus* from *Arabidopsis thaliana* sequences of known biological function. *Genome* **42**, 387-402.

Cahoon, E. B., Hall, S. E., Ripp, K. G., Ganzke, T. S., Hitz, W. D., and Coughlan, S. J., 2004: Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. *Nature biotechnology* **21**, 1082-1087.

Cavell, A. C., Lydiate, D. J., Parkin, I. A. P., Dean, C., and Trick, M., 1998: Collinearity between a 30-centimorgan segment of *Arabidopsis thaliana* chromosome 4 and duplicated regions within the *Brassica napus* genome. *Genome* **41**, 62-69.

Cheng, Z., Sattler, S., Maeda, H., Sakuragi, Y., Bryant, D. A., and DellaPenna, D., 2003: Highly divergent methyltransferases catalyze a conserved reaction in tocopherol and plastoquinone synthesis in cyanobacteria and photosynthetic eukaryotes. *Plant Cell* **15**, 2343-2356.

CODEX. 1999: Codex Standards for Fats and Oils from Vegetable Sources CODEX-STAN 210 - 1999.

Collakova, E. and DellaPenna, D., 2001: Isolation and functional analysis of homogentisate phytyltransferase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **127**, 1113-1124.

- Comai, L., Young, K., Till, B. J., Reynolds, S. H., Greene, E. A., Codomo, C. A., Enns, L. C., Johnson, J. E., Burtner, C., Odden, A. R., and Henikoff, S., 2004: Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling. *Plant J* **37**, 778-786.
- Dähnhardt, D., Falk, J., Appel, J., van der Kooij, T. A., Schulz-Friedrich, R., and Krupinska, K., 2002: The hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 is not required for plastoquinone biosynthesis. *FEBS Lett.* **523**, 177-181.
- DellaPenna, D., 2005: Progress in the dissection and manipulation of vitamin E synthesis. *Trends Plant Sci.* **10**, 574-579.
- DellaPenna, D. and Pogson, B., 2006: Vitamin Synthesis in Plants: Tocopherols and Carotenoids. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 711-738.
- Delourme, R., Falentin, C., Huteau, V., Clouet, V., Horvais, R., Gandon, B., Specel, S., Hanne-ton, L., Dheu, J. E., Deschamps, M., Margale, E., Vincourt, P., and Renard, M., 2006: Genetic control of oil content in oilseed rape *Brassica napus* L. *TAG* **113**, 1331-1345.
- Desel, C., Hubbermann, E., Schwarz, K., and Krupinska, K., 2007: Nitration of γ -tocopherol in plant tissues. *Planta* **226**, 1311-1322.
- Dolde, D., Vlahakis, C., and Hazebroek, J., 1999: Tocopherols in Breeding Lines and Effects of Planting Location, Fatty Acid Composition and Temperature During Development. *JAOCS* **76**, 349-355.
- Dörmann, P., 2007: Functional diversity of tocopherols in plants. *Planta* **225**, 269-276.
- Elmadfa, I., Aign, W., Muskat, E., and Fritzsche, D., 2003: Die große GU Nährwert-Kalorien-Tabelle Gräfe und Unzer Verlag.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., and von Heijne, G., 2000: Predicting Subcellular Localization of Proteins Based on their N-terminal Amino Acid Sequence. *J.Mol.Biol* **300**, 1005-1016.
- Evans, H. M. and Bishop, K. S., 1922: On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science* **56**, 650-651.
- Evans, H. M., Emerson, O. H., and Emerson, G. A., 1936: The isolation from wheat germ oil of an alcohol, α -tocopherol, having the properties of vitamin E. *J.Biol.Chem.* **113**, 319-332.
- Falk, J., Andersen, G., Kernebeck, B., and Krupinska, K., 2003: Constitutive overexpression of barley 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in tobacco results in elevation of the vitamin E content in seeds but not in leaves. *FEBS Lett.* **540**, 35-40.

- Falk, J., Krauß, N., Dähnhardt, D., and Krupinska, K., 2002: The senescence associated gene of barley encoding 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is expressed during oxidative stress. *Journal of Plant Physiology* **159**, 1245-1253.
- Falk, J., Krahnstover, A., van der Kooij, T. A. W., Schlensog, M., and Krupinska, K., 2004: Tocopherol and tocotrienol accumulation during development of caryopses from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Phytochemistry* **65**, 2977-2985.
- FAOSTAT Datenbank, 2006: www.fao.org.
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B., 1983: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal.Biochem* **132**, 6-13.
- FitzJohn, R., Armstrong, T., Newstrom-Lloyd, L., Wilton, A., and Cochrane, M., 2007: Hybridisation within Brassica and allied genera: evaluation of potential for transgene escape. *Euphytica* <http://dx.doi.org/10.1007/s10681-007-9444-0>.
- Fourmann, M., Barret, P., Froger, N., Baron, C., Charlot, F., Delourme, R., and Brunel, D., 2002: From *Arabidopsis thaliana* to *Brassica napus*: development of amplified consensus genetic markers (ACGM) for construction of a gene map. *Theor.Appl.Genet.* **105**, 1196-1206.
- Garcia, I., Rodgers, M., Lenne, C., Rolland, A., Sailland, A., and Matringe, M., 1997: Subcellular localization and purification of a p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from cultured carrot cells and characterization of the corresponding cDNA. *Biochem.J.* **325 (Pt 3)**, 761-769.
- Garcia, I., Rodgers, M., Pepin, R., Hsieh, T. F., and Matringe, M., 1999: Characterization and Subcellular Compartmentation of Recombinant 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase from *Arabidopsis* in Transgenic Tobacco. *Plant Physiol.* **119**, 1507-1516.
- Gilliland, L. U., Magallanes-Lundback, M., Hemming, C., Supplee, A., Koornneef, M., Bentsink, L., and DellaPenna, D., 2006: Genetic basis for natural variation in seed vitamin E levels in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* doi:10.1073/pnas.0606221103.
- Goffman, F. D. and Becker, H. C., 1999: Inheritance of tocopherol contents in seeds of rapeseed (*Brassica napus* L.). Proceedings of the 10th Rapeseed Congress, Canberra, Australia.
- Goffman, F. D. and Becker, H. C., 2002: Genetic variation of tocopherol content in a germplasm collection of *Brassica napus* L. *Euphytica* **125**, 189-196.
- Goffman, F. D. and Möllers, C., 2000: Changes in Tocopherol and Plastochromanol-8 Contents in Seeds and Oil of Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) during Storage As Influenced by Temperature and Air Oxygen. *J.Agric.Food Chem.* **48**, 1605-1609.

- Goffman, F. D., Valesco, L., and Becker, H. C., 1999a: Tocopherols accumulation in developing seeds and pods of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Fett/Lipid* **10**, 400-403.
- Goffman, F. D., Velasco, L., and Thies, W., 1999b: Quantitative determination of tocopherols in single seeds. *Fett/Lipid* **101**, 142-145.
- Grusak, M. A. and DellaPenna, D., 1999: Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 133-161.
- Gupta, P., Rustgi, S., and Kulwal, P., 2005: Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. *Plant Molecular Biology* **57**, 461-485.
- Hass, C., Tang, S., Leonard, S., Traber, M., Miller, J., and Knapp, S., 2006: Three non-allelic epistatically interacting methyltransferase mutations produce novel tocopherol (vitamin E) profiles in sunflower. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **113**, 767-782.
- Havaux, M., Lutz, C., and Grimm, B., 2003: Chloroplast membrane photostability in chlP transgenic tobacco plants deficient in tocopherols. *Plant Physiol* **132**, 300-310.
- Havaux, M., Eymery, F., Porfirova, S., Rey, P., and Dörmann, P., 2005: Vitamin E Protects against Photoinhibition and Photooxidative Stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **17**, 3451-3469.
- Henikoff, S., Till, B. J., and Comai, L., 2004: TILLING. Traditional Mutagenesis Meets Functional Genomics. *Plant Physiol* **135**, 630-636.
- Hofius, D., Hajirezaei, M. R., Geiger, M., Tschiersch, H., Melzer, M., and Sonnewald, U., 2004: RNAi-Mediated Tocopherol Deficiency Impairs Photoassimilate Export in Transgenic Potato Plants. *Plant Physiol* **135**, 1256-1268.
- Hughes, C. T., Gaunt, J. K., and Laidman, D. L., 1971: The subcellular distribution of tocopherols in the green leaves of *Pisum sativum*. *Biochem J.* **124**, 9-10.
- Kanwischer, M., Porfirova, S., Bergmüller, E., and Dörmann, P., 2005: Alterations in tocopherol cyclase activity in transgenic and mutant plants of *Arabidopsis* affect tocopherol content, tocopherol composition, and oxidative stress. *Plant Physiol* **137**, 713-723.
- Kifle, S., Shao, M., Jung, C., and Cai, D., 1999: An improved transformation protocol for studying gene expression in hairy roots of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Cell Reports* **V18**, 514-519.
- Kleber-Janke, T. and Krupinska, K., 1997: Isolation of cDNA clones for genes showing enhanced expression in barley leaves during dark-induced senescence as well as during senescence under field conditions. *Planta* **203**, 332-340.

- Koncz, C. and Schell, J., 1986: The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *MGG* **204**, 383-396.
- Konieczny, A. and Ausubel, F. M., 1993: A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *The Plant Journal* **4**, 403-410.
- Kowalski, S. P., Lan, T. H., Feldmann, K. A., and Paterson, A. H., 1994: Comparative mapping of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea* chromosomes reveals islands of conserved organization. *Genetics* **138**, 499-510.
- Kumar, R., Raclaru, M., Schusseler, T., Gruber, J., Sadre, R., Lühs, W., Zarhloul, K. M., Friedt, W., Enders, D., Frentzen, M., and Weier, D., 2005: Characterisation of plant tocopherol cyclases and their overexpression in transgenic *Brassica napus* seeds. *FEBS Lett.* **579**, 1357-1364.
- Lagercrantz, U., 1998: Comparative mapping between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica nigra* indicates that *Brassica* genomes have evolved through extensive genome replication accompanied by chromosome fusions and frequent rearrangements. *Genetics* **150**, 1217-1228.
- Lagercrantz, U. and Lydiate, D. J., 1996: Comparative genome mapping in *Brassica*. *Genetics* **144**, 1903-10.
- Landry, B. S., Hubert, N., and Etoh, T., 1991: A genetic map for *Brassica napus* based on restriction fragment length polymorphisms detected with expressed DNA sequences. *Genome* **34**, 543-552.
- Li, G., Gao, M., Yang, B., and Quiros, C. F., 2003: Gene for gene alignment between the *Brassica* and *Arabidopsis* genomes by direct transcriptome mapping. *Theor.Appl.Genet.* **107**, 168-180.
- Li, L., Strahwald, J., Hofferbert, H. R., Lubeck, J., Tacke, E., Junghans, H., Wunder, J., and Gebhardt, C., 2005: DNA Variation at the Invertase Locus *invGE/GF* Is Associated With Tuber Quality Traits in Populations of Potato Breeding Clones. *Genetics* **170**, 813-821.
- Lowe, A. J., Moule, C., Trick, M., and Edwards, K. J., 2004: Efficient large-scale development of microsatellites for marker and mapping applications in *Brassica* crop species. *Theor Appl Genet* **108**, 1103-12.
- Lühs, W., Baetzel, R., and Friedt, W., 2000: Zur kombinierbarkeit von hoher Saatgutqualität und wertvollen Korninhaltsstoffen bei Raps (*Brassica napus*): Möglichkeiten und Grenzen. Bericht über die 51. Arbeitstagung 2000 der Vereinigung österreichischer Pflanzenzüchter, BAL Gumpenstein 1-11.
- Lühs, W., Voss, A., Seyis, F., and Friedt, W., 1998: Erweiterung der genetischen Variabilität in der Rapszüchtung durch Resynthese. Ber.Arb.tagung 1998 A.G.Saatzuchtleiter,Gumpenstein 65.

- Lukens, L., Zou, F., Lydiate, D., Parkin, I., and Osborn, T., 2003: Comparison of a *Brassica oleracea* genetic map with the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **164**, 359-372.
- Mackay, G. R., 1973: Interspecific hybrids between forage rape (*Brassica napus* L.) and turnip (*Brassica campestris* L. SSP. *Rapifera*) as alternatives to forage rape. 1. An exploratory study with single pair crosses. *Euphytica* **22**, 495-499.
- Marwede, V., Gul, M. K., Becker, H. C., and Ecke, W., 2005: Mapping of QTL controlling tocopherol content in winter oilseed rape. *Plant Breeding* **124**, 20-26.
- Marwede, V., Schierholt, A., Mollers, C., and Becker, H. C., 2004: Genotype x Environment Interactions and Heritability of Tocopherol Contents in Canola. *Crop Sci* **44**, 728-731.
- Miller, E. R., Pastor-Barriuso, R., Dalal, D., Riemersma, R. A., Appel, L. J., and Guallar, E., 2005: Meta-Analysis: High-Dosage Vitamin E Supplementation May Increase All-Cause Mortality. *Ann.Intern.Med.* **142**, 37-46
- Moghaieb, R. E., El-Awady, M. A., El-Mergawy, r. G., Youssef, S. S., and El-Sharkawy, A. M., 2006: A reproducible protocol for regeneration and transformation in canola (*Brassica napus* L.). *Afr.J.Biotechnol.* **5**, 143-148.
- Motohashi, R., Ito, T., Kobayashi, M., Taji, T., Nagata, N., Asami, T., Yoshida, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K., 2003: Functional analysis of the 37 kDa inner envelope membrane polypeptide in chloroplast biogenesis using a Ds-tagged *Arabidopsis* pale-green mutant. *Plant J.* **34**, 719-731.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H., 1986: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **51**, 263-273.
- Munné-Bosch, S., 2005: The role of alpha-tocopherol in plant stress tolerance. *J Plant Physiol* **162**, 743-748.
- Munné-Bosch, S. and Alegre, L., 2002: The Function of Tocopherols and Tocotrienols in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **21**, 31-57.
- Munné-Bosch, S. and Falk, J., 2004: New insights into the function of tocopherols in plants. *Planta* **218**, 323-326.
- Munne-Bosch, S., 2005: Linking tocopherols with cellular signaling in plants. *New Phytologist* **166**, 363-366.

- Norris, S. R., Shen, X., and DellaPenna, D., 1998: Complementation of the Arabidopsis *pds1* mutation with the gene encoding p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Plant Physiol* **117**, 1317-1323.
- Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., and Hayashi, K., 1989: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* **5**, 874-879.
- Parkin, I. A., Gulden, S. M., Sharpe, A. G., Lukens, L., Trick, M., Osborn, T. C., and Lydiate, D. J., 2005: Segmental Structure of the Brassica napus Genome Based on Comparative Analysis With Arabidopsis thaliana. *Genetics* **171**, 765-781.
- Parkin, I. A., Lydiate, D. J., and Trick, M., 2002: Assessing the level of collinearity between Arabidopsis thaliana and Brassica napus for A. thaliana chromosome 5. *Genome* **45**, 356-366.
- Paterson, A. H., Lan, T. H., Amasino, R., Osborn, T. C., and Quiros, C., 2001: Brassica genomics: a complement to, and early beneficiary of, the Arabidopsis sequence. *Genome Biol.* **2**, reviews1011.1-reviews1011.4.
- Piquemal, J., Cinquin, E., Couton, F., Rondeau, C., Seignoret, E., Doucet, I., Perret, D., Villeger, M.-J., Vincourt, P., and Blanchard, P., 2005: Construction of an oilseed rape (Brassica napus L.) genetic map with SSR markers. *Theor.Appl.Genet.* **111**, 1514-1523.
- Porfirova, S., Bergmüller, E., Tropf, S., Lemke, R., and Dörmann, P., 2002: Isolation of an Arabidopsis mutant lacking vitamin E and identification of a cyclase essential for all tocopherol biosynthesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**, 12495-12500.
- Provencher, L. M., Miao, L., Sinha, N., and Lucas, W. J., 2001: Sucrose export defective1 encodes a novel protein implicated in chloroplast-to-nucleus signaling. *Plant Cell* **13**, 1127-1141.
- Raclaru, M., Gruber, J., Kumar, R., Sadre, R., Lühs, W., Zarhloul, M., Friedt, W., Frentzen, M., and Weier, D., 2006: Increase of the tocochromanol content in transgenic Brassica napus seeds by overexpression of key enzymes involved in prenylquinone biosynthesis. *Molecular Breeding* **18**, 93-107.
- Röbbelen, G., 1973: Der gegenwärtige Stand der Züchtung von Erucasäure-, Linolensäure- und Glucosinolat-Armen Rapssorten. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)* **23**, 221-238.
- Rochefford, T. R., Wong, J. C., Egesel, C. O., and Lambert, R. J., 2002: Enhancement of vitamin E levels in corn. *J.Am.Coll.Nutr.* **21**, 191S-198S.
- Saghai-Marooif, M. A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A., and Allard, R. W., 1984: Ribosomal DNA Spacer-Length Polymorphisms in Barley: Mendelian Inheritance, Chromosomal Location, and Population Dynamics. *PNAS* **81**, 8014-8018.

Sattler, S. E., Cahoon, E. B., Coughlan, S. J., and DellaPenna, D., 2003: Characterization of tocopherol cyclases from higher plants and cyanobacteria. Evolutionary implications for tocopherol synthesis and function. *Plant Physiol* **132**, 2184-2195.

Schledz, M., Seidler, A., Beyer, P., and Neuhaus, G., 2001: A novel phytyltransferase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 involved in tocopherol biosynthesis. *FEBS Lett.* **499**, 15-20.

Seyis F., Snowdon R.J., Lühs W., and Friedt W., 2003: Molecular characterization of novel resynthesized rapeseed (*Brassica napus*) lines and analysis of their genetic diversity in comparison with spring rapeseed cultivars. *Plant Breeding* **122**, 473-478.

Shintani, D. and DellaPenna, D., 1998: Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. *Science* **282**, 2098-2100.

Siebert, P. D., Chenchik, A., Kellogg, D. E., Lukyanov, K. A., and Lukyanov, S. A., 1995: An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* **23**, 1087-1088.

Tang, S., Hass, C., and Knapp, S., 2006: Ty3/gypsy-like retrotransposon knockout of a 2-methyl-6-phytyl-1,4-benzoquinone methyltransferase is non-lethal, uncovers a cryptic paralogous mutation, and produces novel tocopherol (vitamin E) profiles in sunflower. *TAG* **113**, 783-799.

Thies, W., 1997: Entwicklung von Ausgangsmaterial mit erhöhten alpha- oder gamma-Tocopherol-Gehalten im Samenöl für die Körnerraps-Züchtung. I. Quantitative Bestimmung der Tocopherole durch HPLC (Development of starting material with enhanced alpha- or gamma-tocopherol contents in the seed oil for the breeding of new rapeseed cultivars). *Angew.Bot.* **71**, 62-67.

U, N., 1935: Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *Brassica napus* and peculiar mode of fertilization. *Japan J.Bot.* **7**, 389-452.

Ugozzoli, L. and Wallace, R. B., 1991: Allele-specific polymerase chain reaction. *Methods Enzymol.* **2**, 42-48.

Uzunova, M., Ecke, W., Weissleder, K., and Röbbelen, G., 1995: Mapping the genome of rapeseed (*Brassica napus* L.). I. Construction of an RFLP linkage map and localization of QTLs for seed glucosinolate content. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **V90**, 194-204.

Valentin, H. E., Lincoln, K., Moshiri, F., Jensen, P. K., Qi, Q., Venkatesh, T. V., Karunanandaa, B., Baszis, S. R., Norris, S. R., Savidge, B., Gruys, K. J., and Last, R. L., 2006: The *Arabidopsis* vitamin E pathway gene5-1 mutant reveals a critical role for phytol kinase in seed tocopherol biosynthesis. *Plant Cell* **18**, 212-224.

Valvekens, D., Montagu, M. V., and Lijsebettens, M. V., 1988: *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of *Arabidopsis thaliana* Root Explants by Using Kanamycin Selection. *PNAS* **85**, 5536-5540.

Van Eenennaam, A. L., Lincoln, K., Durrett, T. P., Valentin, H. E., Shewmaker, C. K., Thorne, G. M., Jiang, J., Baszis, S. R., Levering, C. K., Aasen, E. D., Hao, M., Stein, J. C., Norris, S. R., and Last, R. L., 2003: Engineering vitamin E content: from Arabidopsis mutant to soy oil. *Plant Cell* **15**, 3007-3019.

Venkatesh, T. V., Karunanandaa, B., Free, D. L., Rottnek, J. M., Baszis, S. R., and Valentin, H. E., 2006: Identification and characterization of an Arabidopsis homogentisate phytyltransferase paralog. *Planta* **223**, 1134-1144.

Wu, Y., Tulsieram, L., Tao, Q., Zhang, H. B., and Rothstein, S. J., 2000: A binary vector-based large insert library for *Brassica napus* and identification of clones linked to a fertility restorer locus for *Ogura* cytoplasmic male sterility (CMS). *Genome* **43**, 102-109.

Zhang, M., Nakamaru, Y., Tsuda, S., Nagashima, T., and Esashi, Y., 1995a: Enzymatic Conversion of Volatile Metabolites in Dry Seeds during Storage. *Plant Cell Physiol.* **36**, 157-164.

Zhang, M., Yoshiyama, M., Nagashima, T., Nakagawa, Y., Yoshioka, T., and Esashi, Y., 1995b: Aging of Soybean Seeds in Relation to Metabolism at Different Relative Humidities. *Plant Cell Physiol.* **36**, 1189-1195.

Anhang

Folgende Sequenzen und Sequenzvergleiche sind im elektronischen Anhang enthalten:

Abbildung 31: Vergleich der *BnPDS1* Sequenzen mit öffentlichen ESTs und der *A. thaliana* Sequenz *PDS1*

Abbildung 32: Vergleich der *BnVTE4-1000* Sequenz mit der *A. thaliana* *VTE4* Sequenz

Abbildung 33: Vergleich der *BnVTE4-750* Sequenzen mit der *A. thaliana* *VTE4* Sequenz

Abbildung 34: Sequenzvergleich der 39 *BnVTE4* cDNA-Klone zur Bestimmung der *BnVTE4* Vollängen-Sequenzen

Abbildung 35: Vergleich der Sequenzen *BnVTE4-1*, *BnVTE4-2*, *BnVTE4-3*, *BnVTE4-4* mit öffentlichen ESTs und der *A. thaliana* *VTE4* Sequenz

Abbildung 36: Vergleich der Sequenz *BnAPG1* mit öffentlichen ESTs und der *A. thaliana* Sequenz *APG1*

Tabelle 24: Übersicht des von der der NPZ (Norddeutsche Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG, Holtsee, Deutschland) zur Tocopherolanalytik zur Verfügung gestellten Saatguts. Angegeben sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Bestimmungen per HPLC.

Saatgut Nr.	Typ	Bezeichnung laut NPZ	Populationstyp	α -Tocopherol (mg/kg)	γ -Tocopherol (mg/kg)	Gesamt-Tocopherol (mg/kg)	α/γ Ratio
070444	Winterraps	Ahl 8107/97	DH-Elter	56	361	417	0,15
				62	383	445	0,16
070445	Winterraps	Amor	DH-Elter	43	209	252	0,20
				22	156	178	0,14
070446	Winterraps	Ar 8067/98	DH-Elter	48	306	354	0,16
				42	244	286	0,17
070447	Winterraps	Chr 1261/92	DH-Elter	44	275	319	0,16
				40	213	253	0,19
070448	Winterraps	DMB 837	DH-Elter	53	310	363	0,17
				52	290	342	0,18
070449	Winterraps	Gru 173/00	DH-Elter	52	276	328	0,19
				49	264	313	0,19
070450	Winterraps	Mar 10902/99	DH-Elter	63	230	293	0,27
				61	224	285	0,27
070451	Winterraps	NPZ 2022	DH-Elter	64	234	298	0,27
				62	219	281	0,28
070452	Winterraps	NPZ 761/99	DH-Elter	48	191	239	0,25
				52	201	253	0,26
070453	Winterraps	NPZ 9915	DH-Elter	44	254	298	0,17
				64	321	385	0,20
070454	Winterraps	Prince	DH-Elter	60	367	427	0,16
				51	296	347	0,17
070455	Winterraps	587	F5	40	312	352	0,13
				39	251	290	0,16
070456	Winterraps	14635	F8	51	217	268	0,23
				57	257	314	0,22
070457	Winterraps	14884	F8	55	278	333	0,20
				43	262	305	0,16
070458	Winterraps	15614	BC2F3	46	212	258	0,22
				41	226	267	0,18

Fortsetzung von Tabelle 24

070459	Winterraps	15634	BC2F3	67	317	384	0,21
				57	289	346	0,20
070460	Winterraps	15662	BC2F3	50	231	281	0,22
				55	236	291	0,23
070461	Winterraps	15693	BC2F3	57	328	385	0,17
				51	266	317	0,19
070462	Winterraps	15707	BC2F3	59	277	336	0,21
				49	264	313	0,19
070463	Winterraps	15748	BC2F3	37	196	233	0,19
				33	180	213	0,18
070464	Winterraps	15762	BC2F3	55	282	337	0,20
				62	279	341	0,22
070465	Winterraps	15771	BC2F3	61	305	366	0,20
				56	290	346	0,19
070466	Winterraps	15784	BC2F3	53	242	295	0,22
				46	198	244	0,23
070467	Winterraps	15825	BC2F3	52	268	320	0,19
				49	267	316	0,18
070468	Winterraps	15858	BC2F3	42	247	289	0,17
				50	200	250	0,25
070469	Winterraps	15895	BC2F3	45	191	236	0,23
				46	152	198	0,31
070470	Winterraps	16136	BC1F3	38	214	252	0,18
				38	244	282	0,16
070471	Winterraps	12242	BC0F4	51	184	235	0,28
				58	217	275	0,27
070472	Winterraps	Göttingen 562	Mutantenlinie	57	335	393	0,17
				69	370	439	0,19
070473	Winterraps	Göttingen 551	Mutantenlinie	54	387	441	0,14
				66	422	488	0,16
070474	Winterraps	Göttingen 400	Mutantenlinie	58	401	459	0,14
				58	404	462	0,14
070475	Winterraps	Göttingen 392	Mutantenlinie	59	425	484	0,14
				65	458	523	0,14
070476	Winterraps	Göttingen 385	Mutantenlinie	64	423	487	0,15
				65	406	471	0,16
070477	Winterraps	Göttingen382	Mutantenlinie	62	426	488	0,14
				60	433	493	0,14
070478	Winterraps	Göttingen 379	Mutantenlinie	56	341	397	0,16
				67	389	456	0,17
070479	Winterraps	Göttingen 375	Mutantenlinie	59	359	418	0,16
				69	434	503	0,16
070480	Winterraps	Göttingen 373	Mutantenlinie	68	478	546	0,14
				59	412	471	0,14
070481	Winterraps	390	F8	37	217	254	0,17
				34	204	238	0,16
070482	Winterraps	877	F4	52	199	251	0,26
				57	204	261	0,28
070483	Winterraps	1108	F5	53	241	294	0,22
				45	210	255	0,21
070484	Winterraps	1930	F5	43	268	311	0,16
				43	270	313	0,16
070485	Winterraps	2118	F5	38	214	252	0,18
				43	239	282	0,18
070486	Winterraps	2989	F5	45	196	241	0,23
				42	209	251	0,20
070487	Winterraps	3233	F4	55	276	331	0,20
				47	267	314	0,17
070488	Winterraps	3281	F4	50	221	271	0,23
				57	268	325	0,21

Fortsetzung von Tabelle 24							
070489	Winterraps	3312	F4	53	212	265	0,25
				66	267	333	0,25
070490	Winterraps	3806	F4	39	172	211	0,23
				54	240	294	0,22
070491	Winterraps	4543	F4	44	260	304	0,17
				36	222	258	0,16
070492	Winterraps	4736	F3	55	248	303	0,22
				60	279	339	0,22
070493	Winterraps	4887	F3	43	196	239	0,22
				52	209	261	0,25
070494	Winterraps	9191	F6	52	258	310	0,20
				47	234	281	0,20
070495	Winterraps	9972	F5	52	260	312	0,20
				50	248	298	0,20
070496	Winterraps	2012	F5	51	256	307	0,20
				47	250	297	0,19
070497	Winterraps	242	F7	41	207	248	0,20
				37	212	259	0,18
070498	Winterraps	2829	F5	42	313	355	0,13
				47	323	370	0,14
070499	Winterraps	2015	k.A.	47	276	323	0,17
				43	259	302	0,17
070500	Winterraps	13172	k.A.	56	246	302	0,23
				60	290	350	0,21
070501	Winterraps	13227	k.A.	45	209	254	0,21
				58	217	275	0,27
070502	Sommerraps	3549	F4	42	259	301	0,16
				40	233	273	0,17
070503	Sommerraps	3686	Linien sorte	61	329	390	0,19
				63	299	362	0,21
070504	Sommerraps	7892	Linien sorte	51	259	310	0,19
				50	241	291	0,21
070505	Sommerraps	7878	Linien sorte	46	198	244	0,23
				49	221	270	0,22
070506	Sommerraps	3124	Linien sorte	44	213	257	0,21
				40	187	227	0,21
070507	Sommerraps	5794	F3	46	283	329	0,16
				41	313	354	0,13
070508	Sommerraps	5909	F3	36	192	228	0,19
				49	258	307	0,19
070509	Sommerraps	5745	F3	51	324	375	0,16
				58	354	412	0,17
070510	Sommerraps	3761	Linien sorte	52	315	377	0,16
				45	280	325	0,16
070511	Sommerraps	6103	F3	70	248	318	0,28
				58	229	287	0,25
070512	Sommerraps	5403	F3	51	272	323	0,19
				44	249	293	0,18
070513	Sommerraps	1537	F5	37	255	292	0,14
				42	275	317	0,15
070514	Sommerraps	1146	F6	53	294	347	0,18
				53	331	384	0,16
070515	Sommerraps	2298	F7	59	271	330	0,22
				55	239	294	0,23
070516	Sommerraps	1555	F8	39	355	394	0,11
				30	249	279	0,12
070517	Sommerraps	6711	Linien sorte	32	189	221	0,17
				37	138	175	0,26
070518	Sommerraps	1581	F5	55	233	288	0,24
				48	204	252	0,23

Fortsetzung von Tabelle 24							
070519	Sommerraps	1568	F5	34 33	269 294	303 327	0,13 0,11

Tabelle 25: Übersicht der zur Kartierung des apg1-Markers verwendeten DH-Linien. S: Samurai-Typ, M: Mansholts Hamburger Raps-Typ

Saatgut Nr.	Bezeichnung	Populationstyp	apg1-Typisierung mittels CAPS-Marker
050268	DH1007	DH-Linie	S
050269	DH1013	DH-Linie	S
050270	DH1018	DH-Linie	S
050272	DH1025	DH-Linie	M
050274	DH1030	DH-Linie	S
050275	DH1033	DH-Linie	M
050276	DH1036	DH-Linie	M
050277	DH1037	DH-Linie	S
050278	DH1038	DH-Linie	S
050279	DH1039	DH-Linie	S
050280	DH1042	DH-Linie	S
050281	DH1044	DH-Linie	S
050284	DH1048	DH-Linie	M
050285	DH1049	DH-Linie	M
050286	DH1052	DH-Linie	M
050287	DH1053	DH-Linie	S
050288	DH1055	DH-Linie	M
050289	DH1056	DH-Linie	S
050290	DH1057	DH-Linie	M
050291	DH1063	DH-Linie	S
050292	DH1071	DH-Linie	M
050293	DH1072	DH-Linie	M
050294	DH1077	DH-Linie	S
050295	DH1079	DH-Linie	M
050296	DH1082	DH-Linie	M
050297	DH1086	DH-Linie	S
050298	DH1087	DH-Linie	S
050299	DH1089	DH-Linie	S
050300	DH1090	DH-Linie	M
050301	DH1091	DH-Linie	M
050302	DH1094	DH-Linie	M
050362	DH2127	DH-Linie	S
050304	DH1097	DH-Linie	S
050305	DH1098	DH-Linie	M
050308	DH1104	DH-Linie	M
050309	DH1108	DH-Linie	M
050310	DH1109	DH-Linie	S
050313	DH1115	DH-Linie	S
050316	DH1119	DH-Linie	M
050317	DH1143	DH-Linie	M
050318	DH1152	DH-Linie	M
050319	DH1160	DH-Linie	S
050320	DH1166	DH-Linie	S
050321	DH2007	DH-Linie	M
050322	DH2012	DH-Linie	M
050323	DH2016	DH-Linie	M
050324	DH2017	DH-Linie	S
050325	DH2021	DH-Linie	S
050326	DH2025	DH-Linie	S
050327	DH2026	DH-Linie	M
050328	DH2027	DH-Linie	S
050329	DH2030	DH-Linie	S

050330	DH2033	DH-Linie	S
050331	DH2034	DH-Linie	M
050332	DH2035	DH-Linie	S
050334	DH2040	DH-Linie	M
050335	DH2050	DH-Linie	S
050336	DH2052	DH-Linie	M
050337	DH2054	DH-Linie	M
050338	DH2055	DH-Linie	S
050339	DH2056	DH-Linie	M
050340	DH2057	DH-Linie	S
050341	DH2058	DH-Linie	S
050344	DH2069	DH-Linie	S
050345	DH2073	DH-Linie	S
050346	DH2074	DH-Linie	M
050347	DH2078	DH-Linie	M
050348	DH2080	DH-Linie	S
050349	DH2085	DH-Linie	M
050350	DH2088	DH-Linie	M
050351	DH2089	DH-Linie	M
050352	DH2093	DH-Linie	M
050353	DH2094	DH-Linie	S
050354	DH2098	DH-Linie	S
050355	DH2100	DH-Linie	M
050356	DH2105	DH-Linie	S
050357	DH2112	DH-Linie	S
050358	DH2114	DH-Linie	S
050359	DH2116	DH-Linie	M
050361	DH2123	DH-Linie	S
050363	Mansholts Hamburger Raps	Liniensorte	M
050364	Samourai	Liniensorte	S

Tabelle 26: Analyse der *BnVTE4* cDNA Klone. Die Analyse erfolgte mit dem Seqman Programm der DNASTar Software unter Verwendung einer Mindesthomologiegrenze von 99 % bzw 100%. Gezeigt ist die Anzahl der Klone die zur den Konsensussequenz *BnVTE4-1* bis *BnVTE4-4* beigetragen haben sowie die Zusammensetzung der Untergruppen nach Erhöhung der Grenze auf 100%.

Sequenz	Anzahl der Klon zur Ermittlung der Konsensussequenz auf 99%-Ebene	Anzahl der Untergruppen auf 100%-Ebene	Anzahl der Klone innerhalb der Untergruppen
<i>BnVTE4-1</i>	23	10	1 x 13, 2 x 2, 7 x 1
<i>BnVTE4-2</i>	8	4	1 x 3, 2 x 2, 1 x 1
<i>BnVTE4-3</i>	4	3	1 x 2, 2 x 1
<i>BnVTE4-4</i>	3	3	1 x2, 1x 1

Danksagung

Für die Bereitstellung des Themas, die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Pflanzenzüchtung zu erstellen und die erhaltene Unterstützung danke ich Herrn Prof. Dr. Christian Jung.

Bei Frau Prof. Dr. Karin Krupinska möchte ich mich für die Mühe und Begeisterung bedanken, mit der Sie das Graduiertenkolleg aufgebaut und geleitet hat.

Der NPZ, besonders Frau Dr. Gunhild Leckband und Herrn Dr. Martin Frauen gilt mein Dank für die Bereitstellung des Saatguts, den Anbau des Tocopherolmaterials und besonders für die Möglichkeit an den NAPUS-Treffen teilzunehmen

Allen Betreuern, Mitstipendiaten und Assoziierten des Graduiertenkollegs danke ich für die lehrreiche und interessante Zeit. Besonders den Gabi/ys und Stephe sei für die lustigen Abende gedankt. Jon Falk gilt mein besonderer Dank, zum einen für die Bereitstellung von Material und Informationen, ganz besonders aber für sein „offenes Ohr“ und der Glaube an das Gelingen dieser Arbeit.

Dr. Wolfgang Ecke möchte ich für die Bereitstellung der Kartierungspopulation und für die Berechnung der Markerposition danken. Jens Herrmann danke ich für seine Unterstützung bei den HPLC-Messungen. Der Arbeitsgruppe von Prof. Meng, insbesondere Chunyu sei für den Austausch von Informationen und die interessanten Diskussionen gedankt.

Bei Prof. Daguang Cai, möchte ich mich für seine Unterstützung, die Tipps und Diskussionen und für das „Asyl“ in seinem Labor bedanken.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Pflanzenzüchtung möchte ich für die gemeinsame Zeit danken (die ja hoffentlich noch nicht vorüber ist). Neben allen Anderen gilt mein Dank besonders Monika, Erwin und Bärbel für die Unterstützung im Gewächshaus. Bei „meiner“ Martina möchte ich mich herzlichst für die erfolgreiche Zusammenarbeit und ihre Hilfe im Labor, besonders bei den Transformationen bedanken. Bei Gina, Katrin, Inga, Irene, Martina, Daniela und Jan möchte ich mich für die unterhaltsame Laborzeit bedanken (was das heißt?). Besonderer Dank gilt Daniela, Katrin, Gina und Gretel für die gelungenen Schaffenspausen. Tina und Katrin danke ich für die gemeinsame Bürozeit mit ihren Höhen und Tiefen. Ganz herzlich danke ich Katrin, für Ihre Freundschaft und Unterstützung über die gesamte Zeit.

Der DFG, meinen Eltern und meinem Mann sei für die finanzielle Unterstützung gedankt.

Meinen Eltern danke ich dafür auf der Welt zu sein und dass sie mich über die gesamte Zeit aus tiefsten Herzen unterstützt haben und mir meine Ausbildung ermöglicht haben. Meinem Enni danke ich für seine Liebe und Geduld, die Aufs und Abs nicht nur ausgehalten zu haben, sondern die letzten Jahre zu den schönsten Jahren bis jetzt gemacht zu haben.

Lebenslauf

Name: Jessica Endrigkeit geb. Lied
Geburtsdatum: 29.08.1977
Geburtsort: Hamburg
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung und beruflicher Werdegang

1984-1988 Grundschule, Tangstedt
1988-1997 Lise-Meitner-Gymnasium, Norderstedt
 Abschluss: Abitur
1997-2002 Studium der Biologie an der Universität Hamburg
 Abschluss: Diplom-Biologin
2002-2005 Stipendiatin im Graduiertenkolleg 820 „Natürliche Antioxidantien - ihr
 Wirkungsspektrum in Pflanzen, Lebensmitteln, Tier und Mensch“ an der
 Christan-Albrechts-Universität zu Kiel
2002-2007 Doktorandin am Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Christan-
 Albrechts-Universität zu Kiel

Publikationen und Vorträge

Endrigkeit, J. und Jung, C., 2006: Isolierung und Charakterisierung von Genen der
Tocopherolsynthese aus Raps (*Brassica napus* L.). Votr. Pflanzenzüchtg. **69**, 49-54