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

### 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 menschliche Ernährung ............................................ 8

1.3.3. Bedeutung der Tocochromanole für die Pflanze ....................................................................... 7

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 Kits ...................................... 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 E. coli ............................................................................... 21

2.5.7. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien ............................................................................ 22

2.5.8. Southern-Analyse ..................................................................................................................... 22

2.5.9. Isolierung 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 (Cleaved amplified polymorphic sequence) Markern ........................ 24

2.8. Verwendete Software .................................................................................................................... 25

2.9. Agrobacterium tumefaciens vermittelter Gentransfer in A. thaliana ........................................... 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 B. napus Sequenzen mit Homologie zu den A. thaliana Genen PDS1, VTE4 und APG1 .............................................................................................. 30

3.2.1. Isolierung und Charakterisierung von B. napus Sequenzen mit Homologie zum A. thaliana Gen PDS1 ............................................................................................................................................... 31

3.2.1.1. PCR Experimente zur Isolierung von B. napus Sequenzen mit Homologie zum A. thaliana Gen PDS1 ........................................................................................................................................................................... 33

3.2.1.2. Untersuchungen zur Expression des BnPDS1 Gens .............................................................. 37

3.2.1.3. Southern-Analyse zur Bestimmung der Kopienzahl von PDS1-Homologen im Rapsgenom .......................................................... 38

3.2.2. Isolierung und Charakterisierung von B. napus Sequenzen mit Homologie zum A. thaliana Gen VTE4 ............................................................................................................................................... 39

3.2.2.1. PCR Experimente zur Isolierung von B. napus Sequenzen mit Homologie zum A. thaliana Gen VTE4 ........................................................................................................................................................................... 41
| 3.2.2.2. | Identifikation der BnVTE4 Vollängensequenz mittels 5' und 3' RACE | 43 |
| 3.2.2.3. | Molekulare Charakterisierung der BnVTE4 Sequenzen | 46 |
| 3.2.2.4. | Untersuchungen zur Expression der BnVTE4 Sequenz | 48 |
| 3.2.2.5. | Southern-Analyse zur Bestimmung der Kopienzahl von VTE4-Homologen im Raps genom | 50 |
| 3.2.2.6. | Funktionsanalyse der Sequenz BnVTE4-1 durch konstitutive Expression in A. thaliana | 51 |
| 3.2.3. | Isolierung und Charakterisierung von B. napus Sequenzen mit Homologie zum A. thaliana Gen APG1 | 54 |
| 3.2.3.1. | Molekulare Charakterisierung der BnAPG1 Sequenz | 56 |
| 3.2.3.2. | Untersuchungen zur Expression des BnAPG1 Gens | 58 |
| 3.2.3.3. | Southern-Analyse zur Bestimmung der Kopienzahl von APG1-Homologen im Raps genom | 60 |
| 3.2.3.4. | Genetische Kartierung der BnAPG1 Sequenz | 61 |
| 3.2.3.5. | Funktionsanalyse des BnAPG1-Gens mittels konstitutiver Expression in A. thaliana | 63 |

4. Diskussion
4.1. Vergleichende Bewertung der Tocopherol-Bestimmung von B. napus | 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 Rapssorten mit veränderten Tocopherolgehalten | 76 |

5. Zusammenfassung | 78 |

6. Summary | 80 |

7. Literaturverzeichnis | 82 |

Danksagung | 96 |

Lebenslauf | 97 |
<table>
<thead>
<tr>
<th>Abkürzungen</th>
<th>Definition</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>2ip</td>
<td>2-Isopentenyladenin</td>
</tr>
<tr>
<td>A</td>
<td>Adenin-Nukleotid</td>
</tr>
<tr>
<td>ACGM</td>
<td><em>amplified consensus marker gene</em></td>
</tr>
<tr>
<td>ATP</td>
<td>Adenosintriphosphat</td>
</tr>
<tr>
<td>BAC</td>
<td><em>bacterial artificial chromosome</em></td>
</tr>
<tr>
<td>BBSRC</td>
<td>Biotechnology and Biological Sciences Research Council</td>
</tr>
<tr>
<td>bp</td>
<td>Basenpaare</td>
</tr>
<tr>
<td>BSA</td>
<td>Rinder-Serumalbumin</td>
</tr>
<tr>
<td>C</td>
<td>Cytosin-Nukleotid</td>
</tr>
<tr>
<td>CAPS</td>
<td><em>cleaved amplified polymorphic sequence</em></td>
</tr>
<tr>
<td>cDNA</td>
<td><em>complementary</em> DNA</td>
</tr>
<tr>
<td>CDS</td>
<td>coding sequences</td>
</tr>
<tr>
<td>CIM</td>
<td>Kallusinduktions-Medium</td>
</tr>
<tr>
<td>cM</td>
<td>centiMorgan</td>
</tr>
<tr>
<td>CTAB</td>
<td>Cetyltrimethylammoniumbromid</td>
</tr>
<tr>
<td>DEPC</td>
<td>Diethylpyrocarbonat</td>
</tr>
<tr>
<td>DH</td>
<td>Doppel-Haploid</td>
</tr>
<tr>
<td>DMSO</td>
<td>Dimethylsulfoxid</td>
</tr>
<tr>
<td>DNA</td>
<td>Desoxyribonukleinsäure</td>
</tr>
<tr>
<td>dNTPs</td>
<td>desoxy-Nuklotide</td>
</tr>
<tr>
<td>E. coli</td>
<td><em>Escherichia coli</em></td>
</tr>
<tr>
<td>EDTA</td>
<td>Ethylendiamintetraessigsäure</td>
</tr>
<tr>
<td>EST</td>
<td><em>expressed sequence tag</em></td>
</tr>
<tr>
<td>EU</td>
<td>Europäische Union</td>
</tr>
<tr>
<td>FAO</td>
<td>Food and Agriculture Organization of The United Nations</td>
</tr>
<tr>
<td>G</td>
<td>Guanin-Nukleotid</td>
</tr>
<tr>
<td>GSS</td>
<td><em>genomic survey sequences</em></td>
</tr>
<tr>
<td>Abkürzungen</td>
<td>Deutscher/Englischer Begriff</td>
</tr>
<tr>
<td>-------------</td>
<td>-----------------------------</td>
</tr>
<tr>
<td>H₂O</td>
<td>Wasser</td>
</tr>
<tr>
<td>HGGT</td>
<td>Homogentisat-Geranylgeranyl-Transferase</td>
</tr>
<tr>
<td>HPLC</td>
<td><em>high performance liquid chromatography</em></td>
</tr>
<tr>
<td>IAA</td>
<td>Indol-3-Essigsäure</td>
</tr>
<tr>
<td>IBA</td>
<td>Indol-3-Buttersäure</td>
</tr>
<tr>
<td>k.A.</td>
<td>keine Angabe</td>
</tr>
<tr>
<td>kbp</td>
<td>Kilobasenpaare</td>
</tr>
<tr>
<td>MAS</td>
<td><em>marker assisted selection</em></td>
</tr>
<tr>
<td>MPBQ</td>
<td>2-Methyl-6-phytyl-1,4-benzoquinone</td>
</tr>
<tr>
<td>ORF</td>
<td><em>open reading frame</em></td>
</tr>
<tr>
<td>p.a.</td>
<td>pro analyti</td>
</tr>
<tr>
<td>PCR</td>
<td>Polymerase-Kettenreaktion</td>
</tr>
<tr>
<td>ppm</td>
<td>parts per million</td>
</tr>
<tr>
<td>PVP</td>
<td>Polyvinylpyrrolidon</td>
</tr>
<tr>
<td>QTL</td>
<td><em>quantitative trait loci</em></td>
</tr>
<tr>
<td>RACE</td>
<td><em>rapid amplification of cDNA ends</em></td>
</tr>
<tr>
<td>RIM</td>
<td>Wurzelinduktions-Medium</td>
</tr>
<tr>
<td>RT-PCR</td>
<td>Reverse-Transkriptase-PCR</td>
</tr>
<tr>
<td>SAM</td>
<td>S-adenosylmethionin</td>
</tr>
<tr>
<td>SAP</td>
<td><em>Shrimp alkaline phosphatase</em></td>
</tr>
<tr>
<td>SDS</td>
<td>Natriumdodecylsulfat</td>
</tr>
<tr>
<td>SEM</td>
<td>Sprosselongations-Medium</td>
</tr>
<tr>
<td>SIM</td>
<td>Sprossinduktions-Medium</td>
</tr>
<tr>
<td>SSCP</td>
<td><em>single strand conformation polymorphism</em></td>
</tr>
<tr>
<td>ssp.</td>
<td>Subspecies</td>
</tr>
<tr>
<td>SSR</td>
<td><em>short sequence repeats</em></td>
</tr>
<tr>
<td>T</td>
<td>Thymin-Nukleotid</td>
</tr>
<tr>
<td>T0</td>
<td>transgene Primärgeneration</td>
</tr>
<tr>
<td>Abkürzung</td>
<td>Bedeutung</td>
</tr>
<tr>
<td>-----------</td>
<td>-----------</td>
</tr>
<tr>
<td>TILLING</td>
<td><em>targeting induced local lesions in genomes</em></td>
</tr>
<tr>
<td>U</td>
<td><em>Unit</em></td>
</tr>
<tr>
<td>UTR</td>
<td><em>untranslated regions</em></td>
</tr>
<tr>
<td>v/v</td>
<td>Volumenprozent</td>
</tr>
<tr>
<td>w/v</td>
<td>Gewichtsprozent</td>
</tr>
</tbody>
</table>
Tabellenverzeichnis

Tabellen

**Tabelle 1**: Übersicht der an der Tocopherolsynthese direkt beteiligten Enzyme und die hierfür in *A. thaliana* 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 Kits ............................................................ 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 Bakterienstämmme ........ 18

**Tabelle 11**: Vollständige cDNA-Sequenzen des *A. thaliana*-Gens *PDS1* sowie homologer Sequenzen weiterer Pflanzenarten und genomische Sequenz der pds1-Mutante aus *A. thaliana*. .................. 32

**Tabelle 12**: Übersicht der hier klonierten Raps Sequenzen mit Homologie zum *A. thaliana* Gen *PDS1* .................................................................................................................................................................. 35

**Tabelle 13**: Übersicht der *B. napus* ESTs mit Homologie zum *PDS1* Gen ........................................ 38

**Tabelle 14**: Vollständige cDNA-Sequenzen des *A. thaliana*-Gens *VTE4* sowie homologer Sequenzen weiterer Pflanzenarten ................................................................. 40

**Tabelle 15**: Übersicht der hier ermittelten genomischen Sequenzen aus *B. napus* mit Homologie zum *A. thaliana* Gen *VTE4* .................................................................................................................................................. 43

**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. ......................................................... 46

**Tabelle 17**: Übersicht der *B. napus* ESTs mit Homologie zum *VTE4* Gen ......................................... 49

**Tabelle 18**: Tocopherolgehalte der Samen von nicht transformierten *A. thaliana* Kontroll-Pflanzen und die *BnVTE4-1*-tragenden Transformanden ........................................................................ 53

**Tabelle 19**: Vollständige cDNA-Sequenzen des *A. thaliana*-Gens *APG1* sowie homologer Sequenzen weiterer Pflanzenarten ........................................................................................................ 55

**Tabelle 20**: Übersicht der *B. napus* ESTs mit Homologie zum *APG1* Gen ........................................ 59

**Tabelle 21**: Ergebnisse der HPLC-Messung zur Bestimmung der Tocopherolgehalte von T1 Samen der das *BnAPG1-Gen* tragenden Transformanden im Vergleich zu nicht transformierten Kontrollpflanzen ........................................................................................................... 65
Tabellenverzeichnis

**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 apg1-Markers verwendeten DH-Linien.................. 94

**Tabelle 26**: Analyse der \textit{BnVTE4} cDNA Klone. ................................................................. 95
Abbildungsverzeichnis

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 B. napus Sequenzen mit Homologie zum A. thaliana Gen PDS1 ............................................................................................................. 34
Abbildung 9: Vergleich der abgeleiteten BnPDS1 Aminosäuresequenz mit der Sequenz der A. thaliana HPPD (AthPDS1) ...................................................................................................................................................... 36
Abbildung 10: Phylogenetischer Baum verschiedener pflanzlicher cDNA Vollängensequenzen (vergl. Tabelle 11) mit Homologie zum PDS1-Gen sowie der hier klonierten Sequenz BnPDS1 .................................................................................................................................................. 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 B. napus Sequenzen mit Homologie zum A. thaliana Gen VTE4 ......................................................................................................................................... 41
Abbildung 14: 5’ und 3’ RACE der BnVTE4 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 A. thaliana VTE4 Proteins (AthVTE4) ........................................................................................................................................ 47
Abbildung 17: Phylogenetischer Baum verschiedener pflanzlicher cDNA Vollängen-Sequenzen (Tabelle 14) mit Homologie zum VTE4-Gen sowie der hier klonierten Sequenz BnVTE4 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 BnVTE4-1000 mit genomischer Raps-DNA t .................. 50
Abbildung 20: Erstellung des Konstrukts pAM194_BnVTE4-1 .......................................................................... 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 *B. napus* Sequenzen mit Homologie zum *A. thaliana* Gen APG1. ................................................................. 56

Abbildung 23: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von BnAPG1 mit der Sequenz des *A. thaliana* APG1 Proteins (AthAPG1). ................................................................. 57

Abbildung 24: Phylogenetischer Baum verschiedener pflanzlicher cDNA Sequenzen (Tabelle 19) mit Homologie zum APG1-Gen sowie der hier klonierten Sequenz BnAPG1. ........................................... 58

Abbildung 25: Gelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte mit den Primern apg 1fw und apg 1rv. .................................................................................................................. 58

Abbildung 26: Southern-Hybridisierung der Sonde BnAPG1 mit genomischer Raps-DNA. 60

Abbildung 27: Gelektrophoretische Auftrennung mit KpnI restringerter PCR-Amplifikate aus einer PCR mit den Primern apg 1fw und apg 1rv im 2 %igen Agarosegel ........................................... 61


Abbildung 29: Das Konstrukt pAM194_BnAPG1. ................................................................................ 64

Abbildung 30: Mittelwerte und Standardfehler der Tocopherolgehalte der T1 Samen geerntet auf sechs T0 von BnAPG1-Transformanden im Vergleich zu untransformierten Kontrollpflanzen. ....... 66

Abbildung 31: Vergleich der BnPDS1 Sequenzen mit öffentlichen ESTs und der *A. thaliana* Sequenz PDS1 ............................................................................................................................ 91

Abbildung 32: Vergleich der BnVTE4-1000 Sequenz mit der *A. thaliana* VTE4 Sequenz .................. 91

Abbildung 33: Vergleich der BnVTE4-750 Sequenzen mit der *A. thaliana* VTE4 Sequenz .................. 91

Abbildung 34: Sequenzvergleich der 39 BnVTE4 cDNA-Klone zur Bestimmung der BnVTE4 Volllängen-Sequenzen ............................................................................................................... 91

Abbildung 35: Vergleich der Sequenzen BnVTE4-1, BnVTE4-2, BnVTE4-3, BnVTE4-4 mit öffentlichen ESTs und der *A. thaliana* VTE4 Sequenz ......................................................... 91

Abbildung 36: Vergleich der Sequenz BnAPG1 mit öffentlichen ESTs und der *A. thaliana* Sequenz APG1 ................................................................................................................ 91
1. Einleitung

1.1. Biologie, züchterische Bearbeitung und Nutzung von Raps


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).


und deren Glucosinolatgehalte im Mehl unter 30 µmol/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 Proteinfraktion, die nach dem Abpressen des Rapsöls verbleibt, wird in der Futtermittelindustrie verwendet.


1.2. Genomforschung und genetische Ressourcen

Einleitung


1.3. Synthese und Funktion der Tocochromanole

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).

<table>
<thead>
<tr>
<th></th>
<th>alpha</th>
<th>beta</th>
<th>gamma</th>
<th>delta</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>R1</td>
<td>CH₃</td>
<td>CH₃</td>
<td>H</td>
<td>H</td>
</tr>
<tr>
<td>R2</td>
<td>CH₃</td>
<td>H</td>
<td>CH₃</td>
<td>H</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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

Abbildung 2: Der Tocopherol-Biosyntheseweg der Pflanzen. Die Kästen symbolisieren die beteiligten Enzyme. 1: HPP-Dioxygenase (HPPD), 2: Homogentisatphytyltransferase (HPT), 3: MPBQ/MSBQ-Methyltransferase, 4: Tocopherolcyclus (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

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Enzymname</th>
<th>Abkürzung</th>
<th>Lokalisation des Enzyms</th>
<th>Gencode</th>
<th>Bezeichnungen des Genlocus</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>p-Hydroxyphenylpyruvat- Dioxygenase</td>
<td>HPPD</td>
<td>Cytoplasma</td>
<td>At1g06590</td>
<td>$PDSI^{2,3}$, $HPD$</td>
</tr>
<tr>
<td>Homogentisatprenyltransferase</td>
<td>HPT</td>
<td>Plastiden</td>
<td>At2g18950</td>
<td>$HPT^{2}$, $VTE2-1^3$, $TPT1$, $HPT$, $ATHPT$</td>
</tr>
<tr>
<td>Tocopherolcyclase</td>
<td>TC</td>
<td>Plastiden</td>
<td>At4g32770</td>
<td>$VTE1^{2,3}$</td>
</tr>
<tr>
<td>MPBQ/DMPBQ-Methyltransferase</td>
<td>MPBQ/DMPBQ</td>
<td>Plastiden</td>
<td>At3g63410</td>
<td>$APG1^{2,3}$, $VTE3$</td>
</tr>
<tr>
<td>$\gamma$-Tocopherolmethyltransferase</td>
<td>gTMT</td>
<td>Plastiden</td>
<td>At1g64970</td>
<td>$G\text{-TMT}^{2}$, $TMT1$, $VTE4^3$</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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 $\alpha$-Form nachweisbar, während in den Samen überwiegend $\gamma$-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).

![Chemical structure of α-Tocopherol](image-url)


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).


<table>
<thead>
<tr>
<th>Quelle</th>
<th>Tocochromanol-Gehalt (mg/kg)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Weizenkeimöl</td>
<td>1850</td>
</tr>
<tr>
<td>Sonnenblumenöl</td>
<td>500</td>
</tr>
<tr>
<td>Maiskeimöl</td>
<td>311</td>
</tr>
<tr>
<td>Rapsöl</td>
<td>300</td>
</tr>
<tr>
<td>Sojaöl</td>
<td>290</td>
</tr>
<tr>
<td>Haselnüsse</td>
<td>266</td>
</tr>
<tr>
<td>Mandeln</td>
<td>252</td>
</tr>
<tr>
<td>Erdnüsse</td>
<td>103</td>
</tr>
<tr>
<td>Walnüsse</td>
<td>60</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Einleitung


1.3.4. Untersuchungen zur Tocopherolakkumulation in Raps

Einleitung

Schädigung sind wiederum $\gamma$- und $\delta$-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


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 allele 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

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

2. **Material und Methoden**

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

Tabelle 3: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien

<table>
<thead>
<tr>
<th>Produkt</th>
<th>Hersteller</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>α$^{32}$P]-dATP</td>
<td>GE Healthcare, München</td>
</tr>
<tr>
<td>α$^{32}$P]-dCTP</td>
<td>GE Healthcare, München</td>
</tr>
<tr>
<td>(N-morpholino)ethansulfonsäure</td>
<td>Duchefa, Haarlem, Niederlande</td>
</tr>
<tr>
<td>2-Isopentenlyadenin</td>
<td>Duchefa, Haarlem, Niederlande</td>
</tr>
<tr>
<td>Adenosintriphosphat (ATP)</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>Agarose Seakem®LE</td>
<td>Invitrogen, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>Ammoniumacetat</td>
<td>Merck, Darmstadt</td>
</tr>
<tr>
<td>Ampicillin Natriumsalz</td>
<td>Duchefa, Haarlem, Niederlande</td>
</tr>
<tr>
<td>Bacto Agar</td>
<td>Applichem, Darmstadt</td>
</tr>
<tr>
<td>Bacto Hefeextrakt</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>Bacto Trypton</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>Borsäure</td>
<td>Applichem, Darmstadt</td>
</tr>
<tr>
<td>Bromphenolblau</td>
<td>Boehringer, Ingelheim</td>
</tr>
<tr>
<td>Carbenicillin di-Natriumsalz</td>
<td>Duchefa, Haarlem, Niederlande</td>
</tr>
<tr>
<td>Cefotaxim Natriumsalz</td>
<td>Duchefa, Haarlem, Niederlande</td>
</tr>
<tr>
<td>Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)</td>
<td>Serva, Heidelberg</td>
</tr>
<tr>
<td>Chloroform</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>Chloroform/Isoamylalkohol</td>
<td>Serva, Heidelberg</td>
</tr>
<tr>
<td>Daichin Agar</td>
<td>Duchefa, Haarlem, Niederlande</td>
</tr>
<tr>
<td>dGTP</td>
<td>Fermentas, St. Leon-Rot</td>
</tr>
<tr>
<td>Diethylpyrocarbonat (DEPC)</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>Dimethylsulfoxid (DMSO)</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>di-Natriumhydrogensulfat</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>dNTP-Mix</td>
<td>Fermentas, St. Leon-Rot</td>
</tr>
<tr>
<td>Material</td>
<td>Hersteller/Ort</td>
</tr>
<tr>
<td>-------------------------</td>
<td>-------------------------------</td>
</tr>
<tr>
<td>dTTP</td>
<td>Fermentas, St. Leon-Rot</td>
</tr>
<tr>
<td>Essigsäure</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>Ethanol p. a.</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>Ethanol, vergällt</td>
<td>BfB, Frankfurt a.M.</td>
</tr>
<tr>
<td>Ethidiumbromid (1 % w/v in H₂O)</td>
<td>Serva, Heidelberg</td>
</tr>
<tr>
<td>Ethylenediamintetraessigsäure (EDTA)</td>
<td>Applichem, Darmstadt</td>
</tr>
<tr>
<td>Formaldehyd 37 %</td>
<td>Merck, Darmstadt</td>
</tr>
<tr>
<td>Formamid</td>
<td>Merck, Darmstadt</td>
</tr>
<tr>
<td>Gamborgs B₅ Elemente und Vitamine</td>
<td>Duchefa, Haarlem, Niederlande</td>
</tr>
<tr>
<td>Glukose</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>Glycerin</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>Heringsperma</td>
<td>Serva, Heidelberg</td>
</tr>
<tr>
<td>Indol-3-Buttersäure (IBA)</td>
<td>Duchefa, Haarlem, Niederlande</td>
</tr>
<tr>
<td>Indol-3-Essigsäure (IAA)</td>
<td>Duchefa, Haarlem, Niederlande</td>
</tr>
<tr>
<td>IPTG</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>Isopropanol p. a.</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>Kanamycin Monosulfat</td>
<td>Duchefa, Haarlem, Niederlande</td>
</tr>
<tr>
<td>Kinetin</td>
<td>Duchefa, Haarlem, Niederlande</td>
</tr>
<tr>
<td>Magnesiumchlorid</td>
<td>Invitrogen, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>MOPS</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>Natriumacetat</td>
<td>Merck, Darmstadt</td>
</tr>
<tr>
<td>Natriumchlorid</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>Natriumdihydrogenphosphat</td>
<td>Applichem, Darmstadt</td>
</tr>
<tr>
<td>Natrium-Dodecylsulfat (SDS), p. a.</td>
<td>Applichem, Darmstadt</td>
</tr>
<tr>
<td>Natriumhydroxid</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>Natriumhypochlorid</td>
<td>Roth, Karlsruhe</td>
</tr>
<tr>
<td>n-Heptan für die HPLC</td>
<td>LGC Promochem, Wesel</td>
</tr>
<tr>
<td>Oligo(dNTP)₆-Primer</td>
<td>Fermentas, St. Leon-Rot</td>
</tr>
</tbody>
</table>
Material und Methoden

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

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Kit</th>
<th>Hersteller</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit</td>
<td>BD Biosciences, Heidelberg</td>
</tr>
<tr>
<td>NucleoSpin® Extract II</td>
<td>Macherey &amp; Nagel, Düren</td>
</tr>
<tr>
<td>NucleoSpin® Plasmid Quick Pure</td>
<td>Macherey &amp; Nagel, Düren</td>
</tr>
<tr>
<td>NucleoSpin® 96 Plant</td>
<td>Macherey &amp; Nagel, Düren</td>
</tr>
</tbody>
</table>
15

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Standard</th>
<th>Hersteller</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>1kB-Leiter</td>
<td>Fermentas, St. Leon-Rot</td>
</tr>
<tr>
<td>λ-DNA</td>
<td>Fermentas, St. Leon-Rot</td>
</tr>
</tbody>
</table>

**Tabelle 6:** Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme

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

2.2. DNA-Klone, Sonden und Oligonukleotide

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Sonde</th>
<th>Größe [bp]</th>
<th>Bemerkung</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>BnAPG1</td>
<td>1243</td>
<td>Amplifiziert aus Klon 3504 mit Primerkombination apg 1fw / apg 1rv</td>
</tr>
<tr>
<td>BnPDS1-750</td>
<td>773</td>
<td>Amplifiziert aus Klon 3503 mit Primerkombination pds 1fw / pds 1rv</td>
</tr>
<tr>
<td>BnVTE4-1000</td>
<td>1063</td>
<td>Amplifiziert aus Klon 3486 mit Primerkombination vte4 1fw / vte4 1rv</td>
</tr>
</tbody>
</table>
**Tabelle 8: Übersicht der erstellten und verwendeten DNA-Klone und der sequenzierten PCR-Produkte**

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

^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).

<table>
<thead>
<tr>
<th>Primername</th>
<th>Primersequenz</th>
<th>Verwendung/Bezeichnung des Amplifikats</th>
<th>Annealing-Temperatur</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>vte4 1fw</td>
<td>5’AGAGAGCCAATGATCTCG</td>
<td>BnVTE4-1000</td>
<td>51 °C</td>
</tr>
<tr>
<td>vte4 1rv</td>
<td>5’CCCTTCAATCATCAATGG</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>vte4 2fw</td>
<td>5’TATATGGGAGGAGGATTGG</td>
<td>BnVTE4-750</td>
<td>57 °C</td>
</tr>
<tr>
<td>vte4 2rv</td>
<td>5’GCGAGATCATTGGCTCTCTC</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>vte4 3fw</td>
<td>5’TATCTCCAACACCTCTCATTATAA</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>vte4 3rv</td>
<td>5’ACGACAATTITTTATTG</td>
<td>BnVTE4</td>
<td>50 °C</td>
</tr>
<tr>
<td>vte4 Xhfw</td>
<td>5’TATCTGAGCCAACCTCTCATTATAA</td>
<td>Integration von XhoI-Schnittstellen in BnVTE4</td>
<td>50 °C</td>
</tr>
<tr>
<td>vte4 Xhorv</td>
<td>5’CTCGAGTTCAATCTCC</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>pds 1fw</td>
<td>5’TCACTGCTCCTTACTCTCC</td>
<td>BnPDS1-750</td>
<td>52 °C</td>
</tr>
<tr>
<td>pds 1rv</td>
<td>5’CACACTCCTTGATCTGATC</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>pds 2fw</td>
<td>5’ATACATTGTTATACGAGG</td>
<td>BnPDS1-1500</td>
<td>50 °C</td>
</tr>
<tr>
<td>pds 2rv</td>
<td>5’ATCTAAGACTGTATAACACC</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>apg 1fw¹</td>
<td>5’ACTACCCGATCTGATAAGC</td>
<td>BnPAG1</td>
<td>51 °C</td>
</tr>
<tr>
<td>apg 2rv¹</td>
<td>5’GGTATTACAAATCATAAGTTG</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>apg Ecofw</td>
<td>5’GAATTCACTACCCCATGCTGATAAGC</td>
<td>Integration von EcoRI-Schnittstellen in BnAPG1</td>
<td>51 °C</td>
</tr>
<tr>
<td>apg Ecorv</td>
<td>5’GAATTCACTACCCCATGCTGATAAGC</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>35S fw</td>
<td>5’CAATCCCACATCTATT</td>
<td>Überprüfung der Konstrukte</td>
<td>--</td>
</tr>
<tr>
<td>SP6</td>
<td>5’CATTTAGTGCACTATAG</td>
<td>Sequenzierprimer</td>
<td>--</td>
</tr>
<tr>
<td>T7</td>
<td>5’TAAACGACTCTACATAGGG</td>
<td>Sequenzierprimer</td>
<td>--</td>
</tr>
<tr>
<td>M13 fw</td>
<td>5’TGTAACGACGCGCCAGT</td>
<td>Sequenzierprimer</td>
<td>--</td>
</tr>
<tr>
<td>M13 rv</td>
<td>5’CAGGAAAACAGCTATGACC</td>
<td>Sequenzierprimer</td>
<td>--</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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

Tabelle 10: Übersicht der zur Klonierung und Transformation verwendeten Bakterienstämm

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

2.4. Pflanzenmaterial

Folgendes Material wurde zur Durchführung der verschiedenen Experimente verwendet:

Raps (Brassica napus):


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 Auf trennung der DNA erfolgte durch eine Gelelektrophorese in 1 x TAE-Puffer. Der Gel lösung 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.

<table>
<thead>
<tr>
<th>10 x TAE-Puffer</th>
<th>10 x Beladungspuffer</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Tris-Acetat</td>
<td>Bromphenolblau</td>
</tr>
<tr>
<td>40 mM</td>
<td>0,1 % (v/v)</td>
</tr>
<tr>
<td>EDTA</td>
<td>Glycerin</td>
</tr>
<tr>
<td>2 mM</td>
<td>50 % (v/v)</td>
</tr>
<tr>
<td>Essigsäure</td>
<td>TAE-Puffer</td>
</tr>
<tr>
<td>20 mM</td>
<td>1 x</td>
</tr>
<tr>
<td>pH 7,5</td>
<td>pH 7,5</td>
</tr>
</tbody>
</table>

### 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 Sequenzergebnisse 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-Maroof et al. 1984) verwendet. Hierzu wurde das Blattmaterial in flüssigem

<table>
<thead>
<tr>
<th>Waschlösung I</th>
<th>Waschlösung II</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Na-Acetat 200 mM</td>
<td>Ammoniumacetat 10 mM</td>
</tr>
<tr>
<td>Ethanol 76 % (v/v)</td>
<td>Ethanol 76 % (v/v)</td>
</tr>
</tbody>
</table>

CTAB-Isolationspuffer

<p>| | |</p>
<table>
<thead>
<tr>
<th></th>
<th></th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Tris/HCl pH 7,5</td>
<td>120 mM</td>
</tr>
<tr>
<td>EDTA pH 8,0</td>
<td>12 mM</td>
</tr>
<tr>
<td>NaCl 800 mM</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>CTAB 1,2 % (w/v)</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>2-Mercaptoethanol*</td>
<td>1,2 % (v/v)</td>
</tr>
</tbody>
</table>

* 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 (Macheray & Nagel, Düren) nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 2.5.5. Plasmidklonierung


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 Dephosphorelierung 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


**LB-Medium**

<table>
<thead>
<tr>
<th>Komponente</th>
<th>Konzentration (w/v)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>NaCl</td>
<td>1 %</td>
</tr>
<tr>
<td>Hefeextrakt</td>
<td>0,5 %</td>
</tr>
<tr>
<td>Trypton</td>
<td>1 %</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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 Waschlösung**

<table>
<thead>
<tr>
<th>Komponente</th>
<th>Konzentration (mM)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Na₂HPO₄</td>
<td>200 mM</td>
</tr>
<tr>
<td>NaCl</td>
<td>3 M</td>
</tr>
<tr>
<td>EDTA</td>
<td>20 mM</td>
</tr>
<tr>
<td>100 x Denhardt</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>PVP</td>
<td>2 % (w/v)</td>
</tr>
<tr>
<td>BSA, Fraktion V</td>
<td>2 % (w/v)</td>
</tr>
<tr>
<td>Ficoll 400</td>
<td>2 % (w/v)</td>
</tr>
</tbody>
</table>

**Waschlösung**

<table>
<thead>
<tr>
<th>Komponente</th>
<th>Konzentration</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>SSC</td>
<td>1 x</td>
</tr>
<tr>
<td>SDS</td>
<td>0,2 %</td>
</tr>
<tr>
<td>GT-Mix</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>dGTP</td>
<td>0,5 mM</td>
</tr>
<tr>
<td>dTTP</td>
<td>0,5 mM</td>
</tr>
</tbody>
</table>
### Material und Methoden

**Hybridisierungslösung**

<table>
<thead>
<tr>
<th>Komponente</th>
<th>Konzentration</th>
<th>Volumen</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Denhardt</td>
<td>5 x oligo(dNTP)$_6$</td>
<td>10 µl</td>
</tr>
<tr>
<td>SSPE</td>
<td>5 x 10 x Klenow-Puffer</td>
<td>10 µl</td>
</tr>
<tr>
<td>SDS</td>
<td>0,2% GT-Mix</td>
<td>5 µl</td>
</tr>
<tr>
<td>Heringsperma-DNA</td>
<td>0,02% (w/v)</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>α$[^{32}P]$-dCTP</td>
<td>1,5 µl</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>α$[^{32}P]$-dATP</td>
<td>1,5 µl</td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>

**20 x SSC**

<table>
<thead>
<tr>
<th>Komponente</th>
<th>Konzentration</th>
<th>Volumen</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Na$_3$-Citrat</td>
<td>0,3 M</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>NaCl</td>
<td>3,0 M</td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>

**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 H$_2$O.

**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.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Komponente</th>
<th>Konzentration</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>MOPS</td>
<td>20 mM</td>
</tr>
<tr>
<td>Natriumacetat</td>
<td>5 mM</td>
</tr>
<tr>
<td>EDTA</td>
<td>1 mM</td>
</tr>
<tr>
<td>pH 7,0</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Beladungspuffer</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>MOPS-Puffer</td>
<td>1 x</td>
</tr>
<tr>
<td>Formaldehyd (37 %)</td>
<td>17,5 % (v/v)</td>
</tr>
<tr>
<td>Formamid</td>
<td>50,0 % (v/v)</td>
</tr>
<tr>
<td>H$_2$O</td>
<td>22,5 % (v/v)</td>
</tr>
</tbody>
</table>
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


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


2.8. Verwendete Software


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


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
- Gamborg B5 Micro and Macro Elemente: 3,18 g/l
- Gamborg B5 Vitamine: 0,112 g/l
- Glukose: 2 % (w/v)
- 2-(N-morpholino)-ethanesulfonsäure: 0,5 g/l
- pH 5,7

### Sprossinduktions-Medium
- 2ip: 5 mg/l
- IAA: 0,15 mg/l
- Carbenicillin: 500 mg/l
- Vancomycin: 100 mg/l
- Kanamycin: 50 mg/l
- Daichin Agar: 1 % (w/v)
- pH 5,7

add. 1 l B5-Medium
**Kallusinduktions-Medium**

<table>
<thead>
<tr>
<th>Komponenten</th>
<th>Konzentration (mg/l)</th>
<th>Puffer A</th>
<th>Konzentration (mM)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>2,4-D</td>
<td>0,5</td>
<td>NaH₂PO₄ x H₂O</td>
<td>200</td>
</tr>
<tr>
<td>Kinetin</td>
<td>0,05</td>
<td>pH 7</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Daichin Agar</td>
<td>1% (w/v)</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>

add. 1 l B5-Medium

**Puffer B**

<table>
<thead>
<tr>
<th>Komponenten</th>
<th>Konzentration (mM)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>pH 5,7</td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>

**Sprosselongations-Medium**

<table>
<thead>
<tr>
<th>Komponenten</th>
<th>Konzentration (mg/l)</th>
<th>Lösung</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Vancomycin</td>
<td>50</td>
<td>X-Gluc-Lösung</td>
</tr>
<tr>
<td>Kanamycin</td>
<td>25</td>
<td>X-Gluc</td>
</tr>
<tr>
<td>Cefotaxim</td>
<td>100</td>
<td>DMSO</td>
</tr>
<tr>
<td>Daichin Agar</td>
<td>1% (w/v)</td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>

add. 1 l B5-Medium

**Wurzelinduktions-Medium**

<table>
<thead>
<tr>
<th>Komponenten</th>
<th>Konzentration (mg/l)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>IBA</td>
<td>0,5</td>
</tr>
<tr>
<td>Vancomycin</td>
<td>50</td>
</tr>
<tr>
<td>Kanamycin</td>
<td>25</td>
</tr>
<tr>
<td>Cefotaxim</td>
<td>100</td>
</tr>
<tr>
<td>Daichin Agar</td>
<td>1% (w/v)</td>
</tr>
</tbody>
</table>

add. 1 l B5-Medium

**pH 5,7**

2.10. HPLC-Methode zur Bestimmung des Tocopherol-Gehaltes

Material und Methoden

(SPEX SamplePrep, Metuchen, USA) aufgeschlossen und bei -20 °C für 12 Stunden extrahiert. Für die Analyse wurden 30 mg bis 80 mg Rapssamen eingesetzt und mit 1000 µl n-Heptan extrahiert. Für die Analyse der *A. thaliana* Samen wurden 3 mg bis 15 mg in 90 µl bis 200 µl 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-10XLFuorescence Detector, Shimadzu, Duisburg). Zur Datenverarbeitung wurde die „ClassVP 5.0“ Software von Shimadzu (Duisburg) verwendet (Beispiel-Chromatogramm siehe Abbildung 6). Das Injektionsvolumen betrug 20 µl. Zur Trennung der Tocopherole wurde eine analytische Kieselgelsäule (5 µm 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 λ = 290 nm und einer Emissionswellenlänge von λ = 328 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


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 Raps-herkünften 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).

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 dienten 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.


- 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 dienten.

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 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
Ergebnisse


Tabelle 11: Volllängen 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

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

\(^1\) 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)

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


Ergebnisse

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.

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.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Bezeichnung</th>
<th>Klon Nr.</th>
<th>Art der Sequenz</th>
<th>Länge (bp)</th>
<th>Start bei Nukleotid Nr.</th>
<th>Ähnlichkeit zu <em>PDS1</em> (%)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td><em>BnPDS1</em>-750</td>
<td>3483</td>
<td>genomisch</td>
<td>735</td>
<td>307</td>
<td>79%</td>
</tr>
<tr>
<td><em>BnPDS1</em>-1500</td>
<td>3484</td>
<td>genomisch</td>
<td>1555</td>
<td>-78</td>
<td>78%</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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](http://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/](http://pfam.sanger.ac.uk/)) ergab, dass die *BnPDS1* Sequenz die erwarteten Domänenmerkmale der Glyoxalase-/Dioxygenase-Superfamilie aufweist.
Ergebnisse


3.2.1.2. Untersuchungen zur Expression des BnPDS1 Gens


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

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

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 Restriktionenzym wurden zwei bis vier Hybridisierungssignale erhalten. Die Analyse der BnPDS1-750 und BnPDS1-1500 Sequenzen ergab, dass keine internen Erkennungssequenzen der verwendeten Restriktionenzymen vorhanden sind.
Ergebnisse


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


**Tabelle 14:** Volllängen cDNA-Sequenzen des \textit{A. thaliana}-Gens \textit{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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Akzessions-Nummer</th>
<th>Ausgangsmaterial</th>
<th>Art/Ökotyp</th>
<th>letzte Aktualisierung</th>
<th>Länge des Leserahmens laut Genbank(bp)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>AF104220</td>
<td>mRNA</td>
<td>\textit{A. thaliana}</td>
<td>Januar 2006</td>
<td>1047</td>
</tr>
<tr>
<td>AY049258</td>
<td>mRNA</td>
<td>\textit{A. thaliana} Columbia</td>
<td>August 2001</td>
<td>1047</td>
</tr>
<tr>
<td>AY087138</td>
<td>mRNA</td>
<td>\textit{A. thaliana}</td>
<td>Januar 2006</td>
<td>1047</td>
</tr>
<tr>
<td>AY090280</td>
<td>mRNA</td>
<td>Columbia</td>
<td>März 2002</td>
<td>1047</td>
</tr>
<tr>
<td>BX814538</td>
<td>mRNA aus Blüten und Knospen single pass read</td>
<td>\textit{A. thaliana} Columbia</td>
<td>Juni 2003 k.A.</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>NM_105171¹</td>
<td>mRNA</td>
<td>\textit{A. thaliana} Columbia</td>
<td>April 2007</td>
<td>1047</td>
</tr>
<tr>
<td>DQ864978</td>
<td>mRNA</td>
<td>\textit{B. juncea}</td>
<td>August 2006</td>
<td>1044</td>
</tr>
<tr>
<td>DQ508019</td>
<td>mRNA</td>
<td>\textit{B. napus “KenCI”}</td>
<td>Mai 2006</td>
<td>1044</td>
</tr>
<tr>
<td>AF381248</td>
<td>mRNA</td>
<td>\textit{B. oleracea}</td>
<td>Januar 2003</td>
<td>1044</td>
</tr>
<tr>
<td>DQ456880</td>
<td>mRNA</td>
<td>\textit{Gossypium hirsutum}</td>
<td>April 2006</td>
<td>1035</td>
</tr>
<tr>
<td>AY960126</td>
<td>mRNA aus Blättern</td>
<td>\textit{Glycine max}</td>
<td>April 2005</td>
<td>1053</td>
</tr>
<tr>
<td>DQ229832</td>
<td>DNA</td>
<td>\textit{Helianthus annuus}</td>
<td>August 2006</td>
<td>945</td>
</tr>
<tr>
<td>DQ013360</td>
<td>mRNA</td>
<td>\textit{Lotus japonicus}</td>
<td>Mai 2005</td>
<td>1077</td>
</tr>
<tr>
<td>DQ456876</td>
<td>mRNA</td>
<td>\textit{Solanum lycopersicum} Medicaco truncatula</td>
<td>April 2006</td>
<td>1089</td>
</tr>
<tr>
<td>AY962639</td>
<td>mRNA aus Blättern</td>
<td>\textit{Medicaco truncatula}</td>
<td>April 2005</td>
<td>1089</td>
</tr>
<tr>
<td>DQ456878</td>
<td>mRNA</td>
<td>\textit{Oryza sativa}</td>
<td>April 2006</td>
<td>1089</td>
</tr>
<tr>
<td>NM_001054379</td>
<td>mRNA</td>
<td>\textit{Oryza sativa}</td>
<td>Oktober 2006</td>
<td>1089</td>
</tr>
<tr>
<td>AF213481</td>
<td>mRNA aus Samen</td>
<td>\textit{Perilla frutescens}</td>
<td>Dezember 2001</td>
<td>1110</td>
</tr>
<tr>
<td>DQ456877</td>
<td>mRNA</td>
<td>\textit{Solanum tuberosum}</td>
<td>April 2006</td>
<td>1107</td>
</tr>
<tr>
<td>DQ139266</td>
<td>mRNA</td>
<td>\textit{Triticum aestivum}</td>
<td>August 2005</td>
<td>1098</td>
</tr>
<tr>
<td>AJ634706</td>
<td>mRNA</td>
<td>\textit{Zea mays}</td>
<td>Januar 2007</td>
<td>1059</td>
</tr>
<tr>
<td>DQ456879</td>
<td>mRNA</td>
<td>\textit{Zea mays}</td>
<td>April 2006</td>
<td>1059</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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


**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 1 rv (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.


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 \( VTE4 \) (\( AthVTE4 \)).

<table>
<thead>
<tr>
<th>Bezeichnung ( BnVTE4 )-750</th>
<th>Bezeichnung ( BnVTE4 )-1000</th>
<th>KlonNr.</th>
<th>Sequenz (bp)</th>
<th>Beginnt bei ( AthVTE4 ) Nukleotid Nr(^1)</th>
<th>Anzahl der Introns(^2)</th>
<th>Anzahl der Introns in ( AthVTE4 )(^3)</th>
<th>Homologie zu ( AthVTE4 ) (%)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>( BnVTE4-750\text{a} )</td>
<td>( BnVTE4-1000 )</td>
<td>3488</td>
<td>737</td>
<td>219</td>
<td>1</td>
<td>1</td>
<td>63</td>
</tr>
<tr>
<td>( BnVTE4-750\text{b} )</td>
<td></td>
<td>3489</td>
<td>741</td>
<td>219</td>
<td>1</td>
<td>1</td>
<td>64</td>
</tr>
<tr>
<td>( BnVTE4-750\text{c} )</td>
<td></td>
<td>3490</td>
<td>739</td>
<td>219</td>
<td>1</td>
<td>1</td>
<td>63</td>
</tr>
<tr>
<td>( BnVTE4-1000 )</td>
<td></td>
<td>3486/3487</td>
<td>1063</td>
<td>938</td>
<td>4</td>
<td>2</td>
<td>80</td>
</tr>
</tbody>
</table>

\(^1\) 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 \( BnVTE4 \) Volllängensequenz 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 \( E. coli \)
Ergebnisse


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 gensezifischen Primer vte 1fw bzw. vte 2rv (Tabelle 9) und den Reagenzien aus dem SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (BD Biosciences). Aufgetrennt wurden 20µl des 50µl-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 gensezifischer Primer), Spur 4: Nullkontrolle (nur mitgeliefert 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

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

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.

<table>
<thead>
<tr>
<th></th>
<th>( BnVTE4-2 )</th>
<th>( BnVTE4-3 )</th>
<th>( BnVTE4-4 )</th>
<th>RACE Kons.</th>
<th>NM_105171</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>( BnVTE4-1 )</td>
<td>98 %</td>
<td>97 %</td>
<td>97 %</td>
<td>98 %</td>
<td>87 %</td>
</tr>
<tr>
<td>( BnVTE4-2 )</td>
<td>--</td>
<td>97 %</td>
<td>98 %</td>
<td>98 %</td>
<td>86 %</td>
</tr>
<tr>
<td>( BnVTE4-3 )</td>
<td>--</td>
<td>--</td>
<td>99 %</td>
<td>99 %</td>
<td>86 %</td>
</tr>
<tr>
<td>( BnVTE4-4 )</td>
<td>--</td>
<td>--</td>
<td>--</td>
<td>98 %</td>
<td>87 %</td>
</tr>
<tr>
<td>RACE</td>
<td>--</td>
<td>--</td>
<td>--</td>
<td>--</td>
<td>87 %</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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).
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.


3.2.2.4. Untersuchungen zur Expression der BnVTE4 Sequenz


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 Spießvarianten.

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

\(^1\)in 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.


Abhängig von dem eingesetzten Restriktionenzym 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 Raps sorte „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 Raps-genom 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 $\gamma$-Tocopherol-Methyltransferasen kodieren. In $A. thaliana$ enthalten die Samen durchschnittlich 95 % $\gamma$-Tocopherol und 5 % $\alpha$-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 $\alpha$-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).

Abbildung 20: Erstellung des Konstruks pAM194_BnVTE4-1 (A) Schritte zur Klonierung der BnVTE4-1 Sequenz in den binären Vektor pAM194. Es wurden Xhol-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 xholfw und vte4 xholrv im 1 %igen Agarosegel bei 70 V für 45 Minuten. Spur 1 und 2: Plasmid-DNA zweier pGemT_BnVTE4-1-Xhol Klone zur Überprüfung der inserierten Sequenz. (C) Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate einer PCR mit den Primern 35S fw und vte4 xholrv 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 Xhol-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).


**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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Pflanze</th>
<th>Samen-Tocopherolgehalt (mg/kg)</th>
<th>Konstrukt</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td></td>
<td>α</td>
<td>β</td>
</tr>
<tr>
<td>Kontrolle</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>6</td>
<td>6</td>
<td>n.n.</td>
</tr>
<tr>
<td>7</td>
<td>7</td>
<td>n.n.</td>
</tr>
<tr>
<td>8</td>
<td>8</td>
<td>n.n.</td>
</tr>
<tr>
<td>8</td>
<td>8</td>
<td>n.n.</td>
</tr>
<tr>
<td>6</td>
<td>6</td>
<td>n.n.</td>
</tr>
<tr>
<td>103</td>
<td>173</td>
<td>2</td>
</tr>
<tr>
<td>177</td>
<td>2</td>
<td>200</td>
</tr>
<tr>
<td>176</td>
<td>371</td>
<td>7</td>
</tr>
<tr>
<td>292</td>
<td>5</td>
<td>99</td>
</tr>
<tr>
<td>90</td>
<td>348</td>
<td>n.n.</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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 transfomierten 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 ($t_{vers} = 6,36 > t_{Tab}(4,1\%) = 2,132$). 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 ($t_{vers} = 4,2 > t_{Tab}(4,1\%) = 2,132$). Der δ-Tocopherolgehalt war mit 8 mg/kg in Bezug zu den 11mg/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-phytlyl-1,4-benzoquinon (MPBQ) in 2,4 Dimethyl-6-phytlyl-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 Volllängen cDNA Sequenzen aus $A. thaliana$ hinterlegt. Diese sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

\begin{table}[h]
\centering
\begin{tabular}{|l|l|l|l|l|}
\hline
\textbf{Akzessionsnummer} & \textbf{Ausgangsmaterial} & \textbf{Ökotyp} & \textbf{letzte Aktualisierung} & \textbf{Leserahmen laut Genbank (bp)} \\
\hline
AB054257 & mRNA & \textit{A. thaliana} Columbia & Februar 2004 & 1017 \\
AY085864 & mRNA & \textit{A. thaliana} Wassilewskija oder Landsberg & Januar 2004 & 1017 \\
BT025886 & mRNA & \textit{A. thaliana} Columbia & Juni 2006 & 1017 \\
BX822319 & mRNA aus Blüten und Knospen & \textit{A. thaliana} Columbia & Februar 2004 & k.A. \\
BX822388 & mRNA aus Blüten und Knospen & \textit{A. thaliana} Columbia & Februar 2004 & k.A. \\
BX823122 & mRNA aus Blüten und Knospen & \textit{A. thaliana} Columbia & Februar 2004 & k.A. \\
BX823184 & mRNA aus Blüten und Knospen & \textit{A. thaliana} Columbia & Februar 2004 & k.A. \\
BX823904 & mRNA aus Blüten und Knospen & \textit{A. thaliana} Columbia & Februar 2004 & k.A. \\
BX825577 & mRNA aus Blüten und Knospen & \textit{A. thaliana} Columbia & Februar 2004 & k.A. \\
NM_116206 & mRNA & \textit{A. thaliana} Columbia & Juni 2006 & 1017 \\
AF162209 & mRNA & \textit{Lactuca sativa} & Dezember 1999 & 583 \\
AM467254 & DNA & \textit{Vitis vinifera} & Mai 2007 & 1023 \\
DQ229837 & DNA & \textit{Helianthus annuus} & August 2006 & 1020 \\
DQ229842 & DNA & \textit{Helianthus annuus} & August 2006 & 1032 \\
DQ229844 & DNA & \textit{Helianthus annuus} & August 2006 & 1032 \\
NM_001073806 & mRNA & \textit{Oryza sativa} & Oktober 2006 & 1047 \\
X56963 & mRNA & \textit{Spinacia oleracea} & April 1991 & 1035 \\
X94968 & mRNA aus Keimlingen & \textit{Nicotiana tabacum} & Juni 1996 & 1008 \\
\hline
\end{tabular}
\end{table}
3.2.3.1. Molekulare Charakterisierung der \textit{BnAPG1} Sequenz

Ausgehend von der Sequenzinformation des \textit{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 \textit{Brassica sp.} ESTs zu identifizieren, aus denen Primer abgeleitet werden konnten, die zur Amplifizierung der \textit{B. napus} Sequenz \textit{BnAPG1} aus der Sorte „Tapidor“ dienten (vergl. Abbildung 22A). Für die vorliegende Arbeit wurden die Sequenzinformationen der Primer \textit{apg 1fw} und \textit{apg 1rv} dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt. Die Primer sind in Tabelle 9 aufgeführt.


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.


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

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

\subsection*{3.2.3.2. Untersuchungen zur Expression des \emph{BnAPG1} Gens}

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

\begin{center}
\textbf{Abbildung 25:} Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte mit den Primern \emph{apg 1fw} und \emph{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
\end{center}
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) diente 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 BnAPG1 Sequenz neben den bereits mittels RT-PCR überprüften Geweben in Blüten, Knospen und im Embryo exprimiert wird. Die BnAPG1 Sequenz zeigt an drei Positionen Nukleotidpolymorphismen zu den EST Sequenzen.

**Tabelle 20:** Übersicht der B. napus ESTs mit Homologie zum APG1 Gen. Ermittelt durch WU-BLAST der APG1 Sequenz gegen die Brassica (DNA) Datenbank. k.A.: keine Angabe

<table>
<thead>
<tr>
<th>EST</th>
<th>Sorte</th>
<th>Gewebe</th>
<th>Länge (bp)</th>
<th>Beginn bei Nukleotid Nr.</th>
<th>Homologie zu BnAPG1(%)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>CD816416</td>
<td>Jet Neuf</td>
<td>Samen</td>
<td>542</td>
<td>-60</td>
<td>99</td>
</tr>
<tr>
<td>CD823316</td>
<td>Jet Neuf</td>
<td>Samen</td>
<td>635</td>
<td>-97</td>
<td>98</td>
</tr>
<tr>
<td>CD817192</td>
<td>Jet Neuf</td>
<td>Samen</td>
<td>681</td>
<td>-25</td>
<td>98</td>
</tr>
<tr>
<td>CD825789</td>
<td>Jet Neuf</td>
<td>Samen</td>
<td>645</td>
<td>-173</td>
<td>99</td>
</tr>
<tr>
<td>CD828005</td>
<td>Jet Neuf</td>
<td>Samen</td>
<td>689</td>
<td>-62</td>
<td>99</td>
</tr>
<tr>
<td>CD829552</td>
<td>Jet Neuf</td>
<td>Samen</td>
<td>578</td>
<td>-25</td>
<td>99</td>
</tr>
<tr>
<td>CD836346</td>
<td>Jet Neuf</td>
<td>Samen</td>
<td>762</td>
<td>-78</td>
<td>94</td>
</tr>
<tr>
<td>CN735033</td>
<td>k.A.</td>
<td>Embryo</td>
<td>662</td>
<td>-83</td>
<td>98</td>
</tr>
<tr>
<td>CX187829</td>
<td>Express</td>
<td>Blüten und Knospen</td>
<td>730</td>
<td>417</td>
<td>98</td>
</tr>
<tr>
<td>CX187838</td>
<td>Express</td>
<td>Blüten und Knospen</td>
<td>727</td>
<td>417</td>
<td>99</td>
</tr>
<tr>
<td>CX187839</td>
<td>Express</td>
<td>Blüten und Knospen</td>
<td>730</td>
<td>417</td>
<td>99</td>
</tr>
<tr>
<td>CX188458</td>
<td>Express</td>
<td>Blüten und Knospen</td>
<td>570</td>
<td>-127</td>
<td>99</td>
</tr>
<tr>
<td>DY006109</td>
<td>k.A.</td>
<td>Samen</td>
<td>325</td>
<td>389</td>
<td>99</td>
</tr>
</tbody>
</table>

1 Berechnet vom Startkodon der BnAPG1 Sequenz

### 3.2.3.3. Southern-Analyse zur Bestimmung der Kopienzahl von \textit{APG1}-Homologen im Rapsgenom

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


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.


werden. Dieses entspricht dem für eine DH-Population erwarteten Spaltungsverhältnis von 1:1 (χ² = 0,114 < χ² Tab(1; 5 %) =3,84).


### 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 Spießstellen 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.


Es wurden 16 Kolonien gepickt. Über PCR mit den Primern 35Sfw und apg 1rv 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 Kostrukt pAM194_BnAPG1-Plasmid Nr. 3502 (Tabelle 8) ausgewählt (Abbildung 29B und C). Dieses enthält die genomische BnAPG1 Sequenz unter der Kontrolle des 35S-Promotors.

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.

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 Reporter, 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.

Tabelle 21: Ergebnisse der HPLC-Messung zur Bestimmung der Tocopherolgehalte von T1 Samen der das BnAPG1-Gen tragenden Transformanden im Vergleich zu nicht transformierten Kontrollpflanzen.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Pflanze</th>
<th>Samen-Tocopherol-Gehalt (mg/kg)</th>
<th>Konstrukt</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td></td>
<td>α</td>
<td>γ</td>
</tr>
<tr>
<td>Kontrolle</td>
<td>6</td>
<td>415</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>7</td>
<td>405</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>8</td>
<td>316</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>8</td>
<td>306</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>6</td>
<td>324</td>
</tr>
<tr>
<td>247</td>
<td>19</td>
<td>405</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>13</td>
<td>399</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>12</td>
<td>365</td>
</tr>
<tr>
<td>117</td>
<td>11</td>
<td>342</td>
</tr>
<tr>
<td>154</td>
<td>12</td>
<td>419</td>
</tr>
<tr>
<td>113</td>
<td>12</td>
<td>444</td>
</tr>
<tr>
<td>188</td>
<td>19</td>
<td>403</td>
</tr>
<tr>
<td>140b</td>
<td>10</td>
<td>302</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>7</td>
<td>362</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>14</td>
<td>348</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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_{vers} = 4,68 > t_{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 Transformanden
Ergebnisse

Die Ergebnisse 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 BnAPG1-Sequenz unter Kontrolle des 35S Promotors. Der Standardfehler ergibt sich aus zehn Wiederholungen.
4. Diskussion


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


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

\(^1\) 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


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


<table>
<thead>
<tr>
<th>Gen</th>
<th>Art</th>
<th>Funktionsnachweis</th>
<th>Referenz</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td><strong>PDS1</strong></td>
<td><strong>Hordeum vulgare</strong></td>
<td>Expression in <em>E. coli</em>; Expression in <em>Nicotiana tabacum</em></td>
<td>Falk et al. (2002), Kleber-Janke und Krupinska (1997)</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td><em>Daucus carota</em></td>
<td>Expression in <em>E. coli</em></td>
<td>Garcia et al. (1997)</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td><em>A. thaliana</em></td>
<td>Komplementation der <em>A. thaliana pds1</em>-Mutante</td>
<td>Norris et al. (1998)</td>
</tr>
<tr>
<td><strong>VTE1</strong></td>
<td><strong>Solanum tuberosum</strong></td>
<td>Enzymtest nach Expression in <em>E. coli</em>; RNAi</td>
<td>Hofius et al. (2004)</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td><em>A. thaliana</em></td>
<td>Enzymtest nach Expression in <em>E. coli</em>, Expression in <em>A. thaliana</em></td>
<td>Porfirova et al. (2002), Sattler et al. (2003), Kanwischer et al. (2005)</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td><em>Zea mays</em></td>
<td>Enzymtest nach Expression in <em>E. coli</em>; Komplementation der Synechocystis Mutante Δstr1737</td>
<td>Provencher et al. (2001), Sattler et al. (2003)</td>
</tr>
<tr>
<td><strong>VTE2</strong></td>
<td><em>A. thaliana</em></td>
<td>Enzymtest nach Expression in <em>E. coli</em></td>
<td>Collakova und DellaPenna (2001)</td>
</tr>
<tr>
<td><strong>APG1</strong></td>
<td><strong>Helianthus annuus</strong></td>
<td>Komplementation der <em>H. annuus</em> Mutante</td>
<td>Tang et al. (2006), Hass et al. (2006)</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td><em>A. thaliana</em></td>
<td>Komplementation der <em>A. thaliana apg1</em>-Mutante; Expression in <em>A. thaliana</em></td>
<td>Cheng et al. (2003), Van Eenennaam et al. (2003), Motohashi et al. (2003)</td>
</tr>
<tr>
<td><strong>VTE4</strong></td>
<td><strong>Helianthus annuus</strong></td>
<td>Kolokalisation mit g–Lokus</td>
<td>Hass et al. (2006)</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td><em>A. thaliana</em></td>
<td>Komplementation der <em>vte4</em> Mutante; Expression in <em>Glycine max</em></td>
<td>Bergmüller et al. (2003), Van Eenennaam et al. (2003)</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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 Volllängen cDNA Fragment unter den
Diskussion

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 \textit{BnPDS1} Sequenz zu überprüfen.


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

Diskussion


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


Für \textit{BnPDS1} konnten auf genomischer Ebene zwei verschiedene Sequenzen über PCR amplifiziert werden. Die gleichen zwei Sequenzen konnten zur Überprüfung auch in anderen Rapsgenotypen identifiziert. Auch die Analyse der ESTs ergab, dass mindestens zwei Kopien des Gens im Rapsgenom vorliegen müssen. Dem widersprach


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.


4.5. Perspektiven für die Züchtung von Rapssorten mit veränderten Tocopherolgehalten


5. Zusammenfassung


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 Tocopherol muster in Samen von *A. thaliana* nachgewiesen werden. Die Expression von *BnVTE4-1* führte zu einer Reduktion des $\gamma$- und $\delta$-Tocopherol-Anteils bei gleichzeitiger Erhöhung des $\alpha$- und $\beta$-Tocopherol-Anteils. Die Expression von *BnAPG1* führte zu einer Erhöhung des $\alpha$-Tocopherol-Anteils bei gleichzeitiger Reduktion des $\delta$-Tocopherol-Anteils. Die Sequenz *BnAPG1* konnte darüber hinaus im Abstand von 14 cM zu einem kartierten QTL für $\alpha$-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 tocochromanol) covers a group of eight antioxidants, four tocopherols and four tocotrienols. Each group harbours a α-, β-, γ- and δ-form. Rape seed 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. BnAPG1 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 BnAPG1 was determined. As a result, the BnAPG1 gene had been mapped to chromosome N07, 14 cM above a previously mapped QTL for α-tocopherol.
7. Literaturverzeichnis


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.


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.


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.


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 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.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Saatgut Nr.</th>
<th>Typ</th>
<th>Bezeichnung laut NPZ</th>
<th>Populationstyp</th>
<th>$\alpha$-Tocopherol (mg/kg)</th>
<th>$\gamma$-Tocopherol (mg/kg)</th>
<th>Gesamt-Tocopherol (mg/kg)</th>
<th>$\alpha/\gamma$ Ratio</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>070444</td>
<td>Winterraps</td>
<td>Ahl 8107/97</td>
<td>DH-Elter</td>
<td>56</td>
<td>361</td>
<td>417</td>
<td>0,15, 0,16</td>
</tr>
<tr>
<td>070445</td>
<td>Winterraps</td>
<td>Amor</td>
<td>DH-Elter</td>
<td>43</td>
<td>209</td>
<td>252</td>
<td>0,20, 0,14</td>
</tr>
<tr>
<td>070446</td>
<td>Winterraps</td>
<td>Ar 8067/98</td>
<td>DH-Elter</td>
<td>48</td>
<td>306</td>
<td>354</td>
<td>0,16, 0,17</td>
</tr>
<tr>
<td>070447</td>
<td>Winterraps</td>
<td>Chr 1261/92</td>
<td>DH-Elter</td>
<td>44</td>
<td>275</td>
<td>319</td>
<td>0,16, 0,19</td>
</tr>
<tr>
<td>070448</td>
<td>Winterraps</td>
<td>DMB 837</td>
<td>DH-Elter</td>
<td>53</td>
<td>310</td>
<td>363</td>
<td>0,17, 0,18</td>
</tr>
<tr>
<td>070449</td>
<td>Winterraps</td>
<td>Gru 173/00</td>
<td>DH-Elter</td>
<td>52</td>
<td>276</td>
<td>328</td>
<td>0,19, 0,19</td>
</tr>
<tr>
<td>070450</td>
<td>Winterraps</td>
<td>Mar 10902/99</td>
<td>DH-Elter</td>
<td>63</td>
<td>230</td>
<td>293</td>
<td>0,27, 0,27</td>
</tr>
<tr>
<td>070451</td>
<td>Winterraps</td>
<td>NPZ 2022</td>
<td>DH-Elter</td>
<td>64</td>
<td>234</td>
<td>298</td>
<td>0,27, 0,27</td>
</tr>
<tr>
<td>070452</td>
<td>Winterraps</td>
<td>NPZ 761/99</td>
<td>DH-Elter</td>
<td>48</td>
<td>191</td>
<td>239</td>
<td>0,25, 0,26</td>
</tr>
<tr>
<td>070453</td>
<td>Winterraps</td>
<td>NPZ 9915</td>
<td>DH-Elter</td>
<td>44</td>
<td>254</td>
<td>298</td>
<td>0,17, 0,20</td>
</tr>
<tr>
<td>070454</td>
<td>Winterraps</td>
<td>Prince</td>
<td>DH-Elter</td>
<td>60</td>
<td>367</td>
<td>427</td>
<td>0,16, 0,17</td>
</tr>
<tr>
<td>070455</td>
<td>Winterraps</td>
<td>587</td>
<td>F5</td>
<td>40</td>
<td>312</td>
<td>352</td>
<td>0,13, 0,16</td>
</tr>
<tr>
<td>070456</td>
<td>Winterraps</td>
<td>14635</td>
<td>F8</td>
<td>51</td>
<td>217</td>
<td>268</td>
<td>0,23, 0,22</td>
</tr>
<tr>
<td>070457</td>
<td>Winterraps</td>
<td>14884</td>
<td>F8</td>
<td>55</td>
<td>278</td>
<td>333</td>
<td>0,20, 0,16</td>
</tr>
<tr>
<td>070458</td>
<td>Winterraps</td>
<td>15614</td>
<td>BC2F3</td>
<td>46</td>
<td>212</td>
<td>258</td>
<td>0,22, 0,18</td>
</tr>
</tbody>
</table>
## Fortsetzung von Tabelle 24

<table>
<thead>
<tr>
<th>Code</th>
<th>Sorte</th>
<th>Sortenummer</th>
<th>Sortenummer 2</th>
<th>Sortenummer 3</th>
<th>Sortenummer 4</th>
<th>Sortenummer 5</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>070459</td>
<td>Winterraps</td>
<td>15634</td>
<td>BC2F3</td>
<td>67</td>
<td>289</td>
<td>384</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>57</td>
<td></td>
<td>346</td>
</tr>
<tr>
<td>070460</td>
<td>Winterraps</td>
<td>15662</td>
<td>BC2F3</td>
<td>50</td>
<td>231</td>
<td>281</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>55</td>
<td>236</td>
<td>291</td>
</tr>
<tr>
<td>070461</td>
<td>Winterraps</td>
<td>15693</td>
<td>BC2F3</td>
<td>57</td>
<td>328</td>
<td>385</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>51</td>
<td>266</td>
<td>317</td>
</tr>
<tr>
<td>070462</td>
<td>Winterraps</td>
<td>15707</td>
<td>BC2F3</td>
<td>59</td>
<td>277</td>
<td>336</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>49</td>
<td>264</td>
<td>313</td>
</tr>
<tr>
<td>070463</td>
<td>Winterraps</td>
<td>15748</td>
<td>BC2F3</td>
<td>37</td>
<td>196</td>
<td>233</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>33</td>
<td>180</td>
<td>213</td>
</tr>
<tr>
<td>070464</td>
<td>Winterraps</td>
<td>15762</td>
<td>BC2F3</td>
<td>55</td>
<td>282</td>
<td>337</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>62</td>
<td>279</td>
<td>341</td>
</tr>
<tr>
<td>070465</td>
<td>Winterraps</td>
<td>15771</td>
<td>BC2F3</td>
<td>61</td>
<td>305</td>
<td>366</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>56</td>
<td>290</td>
<td>346</td>
</tr>
<tr>
<td>070466</td>
<td>Winterraps</td>
<td>15784</td>
<td>BC2F3</td>
<td>53</td>
<td>242</td>
<td>295</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>46</td>
<td>198</td>
<td>244</td>
</tr>
<tr>
<td>070467</td>
<td>Winterraps</td>
<td>15825</td>
<td>BC2F3</td>
<td>52</td>
<td>268</td>
<td>320</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>49</td>
<td>267</td>
<td>316</td>
</tr>
<tr>
<td>070468</td>
<td>Winterraps</td>
<td>15858</td>
<td>BC2F3</td>
<td>42</td>
<td>247</td>
<td>289</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>50</td>
<td>200</td>
<td>250</td>
</tr>
<tr>
<td>070469</td>
<td>Winterraps</td>
<td>15895</td>
<td>BC2F3</td>
<td>45</td>
<td>191</td>
<td>236</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>46</td>
<td>152</td>
<td>198</td>
</tr>
<tr>
<td>070470</td>
<td>Winterraps</td>
<td>16136</td>
<td>BC1F3</td>
<td>38</td>
<td>214</td>
<td>252</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>38</td>
<td>244</td>
<td>282</td>
</tr>
<tr>
<td>070471</td>
<td>Winterraps</td>
<td>12242</td>
<td>BC0F4</td>
<td>51</td>
<td>184</td>
<td>235</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>58</td>
<td>217</td>
<td>275</td>
</tr>
<tr>
<td>070472</td>
<td>Winterraps</td>
<td>Göttingen 562</td>
<td>Mutantenlinie</td>
<td>57</td>
<td>335</td>
<td>393</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>69</td>
<td>370</td>
<td>439</td>
</tr>
<tr>
<td>070473</td>
<td>Winterraps</td>
<td>Göttingen 551</td>
<td>Mutantenlinie</td>
<td>54</td>
<td>387</td>
<td>441</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>66</td>
<td>422</td>
<td>488</td>
</tr>
<tr>
<td>070474</td>
<td>Winterraps</td>
<td>Göttingen 400</td>
<td>Mutantenlinie</td>
<td>58</td>
<td>401</td>
<td>459</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>58</td>
<td>404</td>
<td>462</td>
</tr>
<tr>
<td>070475</td>
<td>Winterraps</td>
<td>Göttingen 392</td>
<td>Mutantenlinie</td>
<td>59</td>
<td>425</td>
<td>484</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>65</td>
<td>458</td>
<td>523</td>
</tr>
<tr>
<td>070476</td>
<td>Winterraps</td>
<td>Göttingen 385</td>
<td>Mutantenlinie</td>
<td>64</td>
<td>423</td>
<td>487</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>65</td>
<td>406</td>
<td>471</td>
</tr>
<tr>
<td>070477</td>
<td>Winterraps</td>
<td>Göttingen382</td>
<td>Mutantenlinie</td>
<td>62</td>
<td>426</td>
<td>488</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>60</td>
<td>433</td>
<td>493</td>
</tr>
<tr>
<td>070478</td>
<td>Winterraps</td>
<td>Göttingen 379</td>
<td>Mutantenlinie</td>
<td>56</td>
<td>341</td>
<td>397</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>67</td>
<td>389</td>
<td>456</td>
</tr>
<tr>
<td>070479</td>
<td>Winterraps</td>
<td>Göttingen 375</td>
<td>Mutantenlinie</td>
<td>59</td>
<td>359</td>
<td>418</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>69</td>
<td>434</td>
<td>503</td>
</tr>
<tr>
<td>070480</td>
<td>Winterraps</td>
<td>Göttingen 373</td>
<td>Mutantenlinie</td>
<td>68</td>
<td>478</td>
<td>546</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>59</td>
<td>412</td>
<td>471</td>
</tr>
<tr>
<td>070481</td>
<td>Winterraps</td>
<td>390</td>
<td>F8</td>
<td>37</td>
<td>217</td>
<td>254</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>34</td>
<td>204</td>
<td>238</td>
</tr>
<tr>
<td>070482</td>
<td>Winterraps</td>
<td>877</td>
<td>F4</td>
<td>52</td>
<td>199</td>
<td>251</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>57</td>
<td>204</td>
<td>261</td>
</tr>
<tr>
<td>070483</td>
<td>Winterraps</td>
<td>1108</td>
<td>F5</td>
<td>53</td>
<td>241</td>
<td>294</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>45</td>
<td>210</td>
<td>255</td>
</tr>
<tr>
<td>070484</td>
<td>Winterraps</td>
<td>1930</td>
<td>F5</td>
<td>43</td>
<td>268</td>
<td>311</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>43</td>
<td>270</td>
<td>313</td>
</tr>
<tr>
<td>070485</td>
<td>Winterraps</td>
<td>2118</td>
<td>F5</td>
<td>38</td>
<td>214</td>
<td>252</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>43</td>
<td>239</td>
<td>282</td>
</tr>
<tr>
<td>070486</td>
<td>Winterraps</td>
<td>2989</td>
<td>F5</td>
<td>45</td>
<td>196</td>
<td>241</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>42</td>
<td>209</td>
<td>251</td>
</tr>
<tr>
<td>070487</td>
<td>Winterraps</td>
<td>3233</td>
<td>F4</td>
<td>55</td>
<td>276</td>
<td>331</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>47</td>
<td>267</td>
<td>314</td>
</tr>
<tr>
<td>070488</td>
<td>Winterraps</td>
<td>3281</td>
<td>F4</td>
<td>50</td>
<td>221</td>
<td>271</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>57</td>
<td>268</td>
<td>325</td>
</tr>
<tr>
<td>Nr.</td>
<td>Sorte</td>
<td>Liniensorte</td>
<td>F1</td>
<td>F2</td>
<td>F3</td>
<td>F4</td>
</tr>
<tr>
<td>---------</td>
<td>------------</td>
<td>-------------</td>
<td>----</td>
<td>----</td>
<td>----</td>
<td>----</td>
</tr>
<tr>
<td>070489</td>
<td>Winterraps</td>
<td>3312</td>
<td>53</td>
<td>66</td>
<td>212</td>
<td>267</td>
</tr>
<tr>
<td>070490</td>
<td>Winterraps</td>
<td>3806</td>
<td>39</td>
<td>54</td>
<td>172</td>
<td>240</td>
</tr>
<tr>
<td>070491</td>
<td>Winterraps</td>
<td>4543</td>
<td>44</td>
<td>36</td>
<td>260</td>
<td>222</td>
</tr>
<tr>
<td>070492</td>
<td>Winterraps</td>
<td>4736</td>
<td>55</td>
<td>60</td>
<td>248</td>
<td>279</td>
</tr>
<tr>
<td>070493</td>
<td>Winterraps</td>
<td>4887</td>
<td>43</td>
<td>52</td>
<td>196</td>
<td>209</td>
</tr>
<tr>
<td>070494</td>
<td>Winterraps</td>
<td>9191</td>
<td>52</td>
<td>47</td>
<td>258</td>
<td>234</td>
</tr>
<tr>
<td>070495</td>
<td>Winterraps</td>
<td>9972</td>
<td>52</td>
<td>50</td>
<td>260</td>
<td>248</td>
</tr>
<tr>
<td>070496</td>
<td>Winterraps</td>
<td>2012</td>
<td>51</td>
<td>47</td>
<td>256</td>
<td>250</td>
</tr>
<tr>
<td>070497</td>
<td>Winterraps</td>
<td>242</td>
<td>41</td>
<td>37</td>
<td>207</td>
<td>212</td>
</tr>
<tr>
<td>070498</td>
<td>Winterraps</td>
<td>2829</td>
<td>42</td>
<td>47</td>
<td>313</td>
<td>323</td>
</tr>
<tr>
<td>070499</td>
<td>Winterraps</td>
<td>2015</td>
<td>47</td>
<td>43</td>
<td>276</td>
<td>259</td>
</tr>
<tr>
<td>070500</td>
<td>Winterraps</td>
<td>13172</td>
<td>56</td>
<td>60</td>
<td>246</td>
<td>290</td>
</tr>
<tr>
<td>070501</td>
<td>Winterraps</td>
<td>13227</td>
<td>45</td>
<td>58</td>
<td>209</td>
<td>217</td>
</tr>
<tr>
<td>070502</td>
<td>Sommerraps</td>
<td>3549</td>
<td>42</td>
<td>40</td>
<td>259</td>
<td>233</td>
</tr>
<tr>
<td>070503</td>
<td>Sommerraps</td>
<td>3686</td>
<td>61</td>
<td>63</td>
<td>329</td>
<td>299</td>
</tr>
<tr>
<td>070504</td>
<td>Sommerraps</td>
<td>7892</td>
<td>51</td>
<td>50</td>
<td>259</td>
<td>241</td>
</tr>
<tr>
<td>070505</td>
<td>Sommerraps</td>
<td>7878</td>
<td>46</td>
<td>49</td>
<td>198</td>
<td>221</td>
</tr>
<tr>
<td>070506</td>
<td>Sommerraps</td>
<td>3124</td>
<td>44</td>
<td>40</td>
<td>213</td>
<td>187</td>
</tr>
<tr>
<td>070507</td>
<td>Sommerraps</td>
<td>5794</td>
<td>46</td>
<td>41</td>
<td>283</td>
<td>313</td>
</tr>
<tr>
<td>070508</td>
<td>Sommerraps</td>
<td>5909</td>
<td>36</td>
<td>49</td>
<td>192</td>
<td>258</td>
</tr>
<tr>
<td>070509</td>
<td>Sommerraps</td>
<td>5745</td>
<td>51</td>
<td>58</td>
<td>324</td>
<td>354</td>
</tr>
<tr>
<td>070510</td>
<td>Sommerraps</td>
<td>3761</td>
<td>52</td>
<td>45</td>
<td>315</td>
<td>280</td>
</tr>
<tr>
<td>070511</td>
<td>Sommerraps</td>
<td>6103</td>
<td>70</td>
<td>58</td>
<td>248</td>
<td>229</td>
</tr>
<tr>
<td>070512</td>
<td>Sommerraps</td>
<td>5403</td>
<td>51</td>
<td>44</td>
<td>272</td>
<td>249</td>
</tr>
<tr>
<td>070513</td>
<td>Sommerraps</td>
<td>1537</td>
<td>37</td>
<td>42</td>
<td>255</td>
<td>275</td>
</tr>
<tr>
<td>070514</td>
<td>Sommerraps</td>
<td>1146</td>
<td>53</td>
<td>53</td>
<td>294</td>
<td>331</td>
</tr>
<tr>
<td>070515</td>
<td>Sommerraps</td>
<td>2298</td>
<td>59</td>
<td>55</td>
<td>271</td>
<td>239</td>
</tr>
<tr>
<td>070516</td>
<td>Sommerraps</td>
<td>1555</td>
<td>39</td>
<td>30</td>
<td>355</td>
<td>249</td>
</tr>
<tr>
<td>070517</td>
<td>Sommerraps</td>
<td>6711</td>
<td>32</td>
<td>37</td>
<td>189</td>
<td>138</td>
</tr>
<tr>
<td>070518</td>
<td>Sommerraps</td>
<td>1581</td>
<td>55</td>
<td>48</td>
<td>233</td>
<td>204</td>
</tr>
</tbody>
</table>
### Fortsetzung von Tabelle 24

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


<table>
<thead>
<tr>
<th>Saatgut Nr.</th>
<th>Bezeichnung</th>
<th>Populationstyp</th>
<th>apg1-Typisierung mittels CAPS-Marker</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>050268</td>
<td>DH1007</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>S</td>
</tr>
<tr>
<td>050269</td>
<td>DH1013</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>S</td>
</tr>
<tr>
<td>050270</td>
<td>DH1018</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>S</td>
</tr>
<tr>
<td>050272</td>
<td>DH1025</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>M</td>
</tr>
<tr>
<td>050274</td>
<td>DH1030</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>S</td>
</tr>
<tr>
<td>050275</td>
<td>DH1033</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>M</td>
</tr>
<tr>
<td>050276</td>
<td>DH1036</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>M</td>
</tr>
<tr>
<td>050277</td>
<td>DH1037</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>S</td>
</tr>
<tr>
<td>050278</td>
<td>DH1038</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>S</td>
</tr>
<tr>
<td>050279</td>
<td>DH1039</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>S</td>
</tr>
<tr>
<td>050280</td>
<td>DH1042</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>S</td>
</tr>
<tr>
<td>050281</td>
<td>DH1044</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>S</td>
</tr>
<tr>
<td>050284</td>
<td>DH1048</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>M</td>
</tr>
<tr>
<td>050285</td>
<td>DH1049</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>M</td>
</tr>
<tr>
<td>050286</td>
<td>DH1052</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>M</td>
</tr>
<tr>
<td>050287</td>
<td>DH1053</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>S</td>
</tr>
<tr>
<td>050288</td>
<td>DH1055</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>M</td>
</tr>
<tr>
<td>050289</td>
<td>DH1056</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>S</td>
</tr>
<tr>
<td>050290</td>
<td>DH1057</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>M</td>
</tr>
<tr>
<td>050291</td>
<td>DH1063</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>S</td>
</tr>
<tr>
<td>050292</td>
<td>DH1071</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>M</td>
</tr>
<tr>
<td>050293</td>
<td>DH1072</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>M</td>
</tr>
<tr>
<td>050294</td>
<td>DH1077</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>S</td>
</tr>
<tr>
<td>050295</td>
<td>DH1079</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>M</td>
</tr>
<tr>
<td>050296</td>
<td>DH1082</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>M</td>
</tr>
<tr>
<td>050297</td>
<td>DH1086</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>S</td>
</tr>
<tr>
<td>050298</td>
<td>DH1087</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>S</td>
</tr>
<tr>
<td>050299</td>
<td>DH1089</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>S</td>
</tr>
<tr>
<td>050300</td>
<td>DH1090</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>M</td>
</tr>
<tr>
<td>050301</td>
<td>DH1091</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>M</td>
</tr>
<tr>
<td>050302</td>
<td>DH1094</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>M</td>
</tr>
<tr>
<td>050362</td>
<td>DH2127</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>S</td>
</tr>
<tr>
<td>050304</td>
<td>DH1097</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>S</td>
</tr>
<tr>
<td>050305</td>
<td>DH1098</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>M</td>
</tr>
<tr>
<td>050308</td>
<td>DH1104</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>M</td>
</tr>
<tr>
<td>050309</td>
<td>DH1108</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>M</td>
</tr>
<tr>
<td>050310</td>
<td>DH1109</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>S</td>
</tr>
<tr>
<td>050313</td>
<td>DH1115</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>S</td>
</tr>
<tr>
<td>050316</td>
<td>DH1119</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>M</td>
</tr>
<tr>
<td>050317</td>
<td>DH1143</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>M</td>
</tr>
<tr>
<td>050318</td>
<td>DH1152</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>M</td>
</tr>
<tr>
<td>050319</td>
<td>DH1160</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>S</td>
</tr>
<tr>
<td>050320</td>
<td>DH1166</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>S</td>
</tr>
<tr>
<td>050321</td>
<td>DH2007</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>M</td>
</tr>
<tr>
<td>050322</td>
<td>DH2012</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>M</td>
</tr>
<tr>
<td>050323</td>
<td>DH2016</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>M</td>
</tr>
<tr>
<td>050324</td>
<td>DH2017</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>S</td>
</tr>
<tr>
<td>050325</td>
<td>DH2021</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>S</td>
</tr>
<tr>
<td>050326</td>
<td>DH2025</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>S</td>
</tr>
<tr>
<td>050327</td>
<td>DH2026</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>M</td>
</tr>
<tr>
<td>050328</td>
<td>DH2027</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>S</td>
</tr>
<tr>
<td>050329</td>
<td>DH2030</td>
<td>DH-Linie</td>
<td>S</td>
</tr>
<tr>
<td>Sequenz</td>
<td>Anzahl der Klon zur Ermittlung der Konsensussequenz auf 99%-Ebene</td>
<td>Anzahl der Untergruppen auf 100%-Ebene</td>
<td>Anzahl der Klone innerhalb der Untergruppen</td>
</tr>
<tr>
<td>-----------</td>
<td>---------------------------------------------------------------</td>
<td>----------------------------------------</td>
<td>------------------------------------------</td>
</tr>
<tr>
<td>BnVTE4-1</td>
<td>23</td>
<td>10</td>
<td>1 x 13, 2 x 2, 7 x 1</td>
</tr>
<tr>
<td>BnVTE4-2</td>
<td>8</td>
<td>4</td>
<td>1 x 3, 2 x 2, 1 x 1</td>
</tr>
<tr>
<td>BnVTE4-3</td>
<td>4</td>
<td>3</td>
<td>1 x 2, 2 x 1</td>
</tr>
<tr>
<td>BnVTE4-4</td>
<td>3</td>
<td>3</td>
<td>1 x 2, 1 x 1</td>
</tr>
</tbody>
</table>
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.


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.


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 zuhaben, 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
2002-2007 Doktorandin am Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Publikationen und Vorträge