

Zusammenfassung

Raps ist die dritt wichtigste Ölfrucht weltweit. Die Ölspeicherung im Samen ist ein komplexer Prozess, der durch viele Gene reguliert wird. Der dabei erreichte Ölgehalt wird durch ein Gleichgewicht zwischen Aufbau- und Abbauprozessen bestimmt. Bis heute konzentrierte sich die Forschung hauptsächlich auf Aufbauprozesse, um den Ölgehalt im Samen zu erhöhen. Aus diesem Grund ist es wichtig, nun auch die Abbauprozesse genauer zu untersuchen. In dieser Arbeit wurden die sogenannten *SEED FATTY ACID REDUCER (SFAR)* Gene ausgeschaltet, von denen bekannt ist, daß sie in Arabidopsis am Ölabbau beteiligt sind. Dazu wurden zwei Ansätze, CRISPR-Cas und EMS Mutagenese gewählt.

Für die fünf bekannten *SFAR* Gene *AtSFAR1-5* aus Arabidopsis konnte ich 12 homologe Gene identifizieren. Jede Genfamilie bestand aus zwei Paralogen außer *BnSFAR4*, die vier Paraloge besaß. Die *BnSFAR4*-Genfamilie konnte aufgrund von Sequenzhomologien in zwei Unterfamilien aufgeteilt werden. In Express-617 wurde die Genexpression während der Samenreife 15, 25, 35, 45 und 55 Tage nach Bestäubung gemessen. Aufgrund der relativen Genexpression wählte ich die Genfamilien *BnSFAR1*, *BnSFAR4* und *BnSFAR5* für die funktionelle Analyse aus.

Um Mutationen in den Paralogen von *BnSFAR1* und *BnSFAR4* zu identifizieren, untersuchte ich eine Winterrapspopulation, die chemisch mit EMS mutagenisiert worden war. Ich fand insgesamt 163 Mutationen in allen 5 Paralogen, darunter 7 Nonsense-, 103 Missense-, 46 Silent, 6 Splice Site-Mutationen und 1 UTR-Mutation. Nonsense-Mutationen gab es in allen Genen außer in *Bna.SFAR1.Ann*. Ich wählte für dieses Paralog eine Splice Site- und eine Missense-Mutation in einer funktionellen Aminosäure aus, für die anderen 5 Paraloge jeweils eine Nonsense-Mutation. Zur Erzeugung von Doppelmutanten wurden die Einzelmutanten in jeder Genfamilie gekreuzt. Mittels CRISPR-Cas schaltete ich alle Paralogen in *BnSFAR4* und *BnSFAR5* gleichzeitig mit spezifischen Zielsequenzen aus. Nach Hypokotyltransformation des Winterraps RS306 mit Agrobakterium erhielt ich fünf transgene T₁ Pflanzen für *BnSFAR4* und eine für *BnSFAR5*, was einer Transformationseffizienz von 0,3-1,1 % entsprach. Ich wählte zwei *BnSFAR4* T₁ Pflanzen und die einzelne *BnSFAR5* T₁ Pflanze für weitere Untersuchungen aus. Ich fand vollständige Gen-Editierung in *BnSFAR4*, was Vierfachmutanten entsprach. Die *BnSFAR5* T₁ Pflanze war chimär, aber die Mutationen konnten in der T₂ Generation fixiert werden. Die T₂ und die T₃ generation wurden für die phänotypische Analyse verwendet.

Der Ölgehalt im Samen wurde in sechs spaltenden F₂ Populationen von Kreuzungen zwischen M₃-Einzelmutanten bzw. Kreuzungem zwischen einmal mit Express-617 rückgekreuzten M₃-Einzelmutanten bestimmt. In beiden Kreuzungsnachkommenschaften war der Ölgehalt in *BnSFAR4.a* Doppelmutanten um 12,1% bzw. 8,9% erhöht, in *BnSFAR4.a* Doppelmutanten um 10,3 % bzw. 8,7%, wenn man mit spaltenden Wildtyppflanzen verglich. In *BnSFAR1* Doppelmutanten fand sich keine signifikante Erhöhung in beiden Kreuzungspopulationen. Einzelmutanten zeigten in keiner Population einen signifikanten Effekt. In *BnSFAR4* und *BnSFAR5* CRISPR-Cas9 Mutanten war der Ölgehalt in der T₂ und T₃ Generation verglichen mit dem Wildtyp für *BnSFAR4* um 14,5% und 12,9% erhöht, für *BnSFAR5* um 10,4% und 11,2%. Eine Analyse des Fettsäuremusters zeigte in *BnSFAR4* T₂ eine signifikante Senkung des Erucasäuregehalts (C22:1), verbunden mit einer nicht-signifikanten Erhöhung von C18:1 und C18:3.

Die Öltröpfchengröße war in CRISPR-Cas9 T₂ Mutanten signifikant größer als im Wildtyp RS306. Die Öllakkumulation erreichte nach 45 Tagen ihr Maximum sowohl im Wildtyp (37,8%) als auch in der Mutante (40,3%), nahm aber anschließend bis zur Samenreife im Wildtyp stärker ab als in den Mutanten (33,7% vs. 38,2%). Während der Samenkeimung wurde das Öl in RS306 schneller mobilisiert als in *BnSFAR4* und *BnSFAR5* T₄ Mutanten. Die Keimungsrate und die frühe Keimlingsentwicklung waren in den Mutanten nicht signifikant verändert und zeigten keine pleiotropen Effekte.

Die Anzahl der Hintergrundmutationen wurde durch Rückkreuzungen mit der frühblühenden Sommerrapsorte Peace verringert und mit AFLP Markern und einem 15K Illumina InfiniumTM SNP Array überprüft. In BC₁ konnte ich Pflanzen mit einem Anteil von 84% des Peace-Genoms selektieren. Einzelmutanten, die mittels SNP Array selektiert wurden, sollen für weitere Untersuchungen zu Doppelmutanten gekreuzt werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß ein Funktionsverlust von *BnSFAR4* and *BnSFAR5* zu einer Erhöhung des Ölgehalts in Rapsamen führt. In *BnSFAR4* scheint dieser Funktionsverlust keine negativen Auswirkungen auf die Samenkeimung und frühe Keimlingsentwicklung zu haben. Da Einzelmutanten keine Effekte zeigten, weil ihre Wirkung durch funktionelle Homologe ausgeglichen wird, ist ihre Kreuzung zu Doppelmutanten notwendig. Durch eine markergestützte genomische Hintergrundselektion in Rückkreuzungen des EMS mutagenisierten Winterraps mit einem Sommerraps können unerwünschte Mutationen schnell entfernt werden.