

Zusammenfassung Dekanat

Functional analysis and mutagenesis of glucosinolate synthesis genes for breeding oilseed rape (*Brassica napus*) with lower glucosinolate content

Die Verwendung von Raps (*Brassica napus* L.) als Tierfutter erfordert eine Reduktion von antinutritiven Verbindungen wie Glucosinolaten (GSL) im Rapsschrot, um Gesundheitsschäden bei Nutztieren insbesondere durch aliphatische GSL zu vermeiden. Funktionelle Analysen der an der Regulation des GSL-Stoffwechsels beteiligten Gene sind in polyploidem Raps noch immer eine Herausforderung.

Ich habe eine neuartige TILLING by Whole-Genome Sequencing Plattform entwickelt, in der das komplette Genom von M₂ Familien einer Winterraps-EMS-Mutantenpopulation sequenziert wurde und damit EMS-induzierte Mutationen im gesamten Rapsgenom nachgewiesen werden können. Diese Ressource lieferte mit hoher Qualität 78.150.284 C→T- und G→A-Mutationen aus den Sequenzierungsdaten von 1.988 M₂-Pflanzen. Im Durchschnitt besaß jede Pflanze circa 39.000 Mutationen mit einer Häufigkeit von 1/23,6 kb. Ungefähr 82% der Mutationen befanden sich außerhalb von kodierenden Genregionen, 18% lagen innerhalb der kodierenden Regionen. Davon waren 0,4% Nonsense-, 7,0% Missense-, 4,1% synonyme Mutationen und 4,9% lagen in Introns. Eine aus den gesamten Sequenzierungsdaten entwickelte webbasierte Ressource ermöglicht eine benutzerfreundliche Identifikation von EMS-Mutationen in jeder beliebigen interessanten genomischen Region. Für die *Arabidopsis*-Orthologe *AtMYB28*, *AtCYP79F1* und *AtGTR2* habe ich jeweils drei, zwei bzw. sieben Homöologe in Rapssamen identifiziert. Aufgrund der Genexpression aller Homöologen im Winterraps Express617 in Samen und Blättern 15 bis 45 Tage nach der Bestäubung wählte ich die beiden am höchsten exprimierten Paraloge jeder Genfamilie für funktionelle Analysen aus. Ein konventionelles gelbasiertes Screening der EMS-mutagenisierten Winterraps-Population lieferte 105 Mutationen in den sechs ausgewählten Homöologen. Für die funktionelle Analyse wurden für die Gene *BnMYB28.C09*, *BnMYB28.A03*, *BnCYP79F1.C05*, *BnGTR2.C03* und *BnGTR2.A06* Nonsense-Mutationen ausgewählt, für das Gen *BnCYP79F1.A06* eine Missense-Mutation, die zu einem Austausch der Aminosäure Glutaminsäure gegen Lysin führt.

Die Einzelmutanten wurden sowohl zu Doppelmutanten gekreuzt als auch mit dem Sommerraps Peace rückgekreuzt, um den Anteil von Hintergrundmutationen zu reduzieren, und in der BC₁-Generation Mutanten mit 80-85% Peace-Genomanteil mit einem 19K *Brassica* SNP-Array selektiert. Der GLS-Gehalt und die GLS-Zusammensetzung wurden in den F₂-Populationen 200527 und 200529 aus den M₃xM₃-Kreuzungen (*BnMYB28* bzw. *BnCYP79F1*) und den BC₁F₂-Populationen 210465 und 210462 aus den Rückkreuzungen mit untersucht. Bei *BnMYB28*-Doppelmutanten (F₂-Population 200527) war der Gesamt-GSL-Gehalt in Samen gegenüber Pflanzen mit Wildtyp-Allelen um 52,9% reduziert. Bei *BnCYP79F1*-Mutanten (F₂-Population 200529) wurde keine signifikante Reduktion der Gesamt-GSL beobachtet. In beiden Fällen waren aber die Werte der prominentesten aliphatischen GLS-Verbindung Progoitrin signifikant reduziert (um 55,3% bei Doppelmutanten von *BnMYB28* und 32,4% bei *BnCYP79F1*). In den spaltenden BC₁F₂ waren die Samen-GLS nicht signifikant reduziert, lediglich die Blatt-GSL der *BnMYB28*-Doppelmutanten zeigten eine signifikante Reduktion.

Für die *BnGTR2* Mutanten wurden die F₂-Populationen 205872 und 205873 erzeugt, und die BC₁F₂-Populationen 210631 und 210710. Für zukünftige Experimente mit CRISPR-Cas9 Genome Editing entwickelte ich transformationsfähige Vektoren mit Zielsequenzen für alle sieben *BnGTR2*-Homöologe (*BnGTR2.C03*, *BnGTR2.A06*, *BnGTR2.C09*, *BnGTR2.A09*, *BnGTR2.A02*, *BnGTR2.C02.a* und *BnGTR2.C02.b*).