

**ABSCHLUSSBERICHT****Industrieraps - Biotechnologie II****Teilvorhaben: Gentechnische Steigerung des Ölsäure-  
gehaltes in Raps****Berichtszeitraum: 01.01.1993 bis 30.06.1995****Projektleiter:** Prof. Dr. Ernst Heinz**Mitarbeiter:** Dr. Hermann Schmidt

Dr. Petra Sperling

**Einleitung**

Raps ist die produktivste Ölseed, die in den gemäßigten Klimazonen angebaut wird. Die Triacylglycerine herkömmlichen Rapsöls bestehen zu 60-70% aus einfach ungesättigter Ölsäure und zu 30-40% aus Linol-, Linolen- und Palmitinsäure. Ein Samenöl in Form reiner Trioleate sowie ein Speiseöl ohne Reste von Linolensäure sind Produkte, deren Verarbeitung von Chemie und Nahrungsmittelindustrie seit langem gewünscht wird. Wenn es gelänge, die Fettsäurezusammensetzung im Samenöl entsprechend zu modifizieren, würden Anbau und Absatz dieses Hoch-Ölsäure Rapses erheblich ausgeweitet werden können.

Ziel des High-Oleic Projektes ist ein gentechnologischer Eingriff in die Fettsäuredesaturierung bei der Akkumulation von Triacylglycerinen in Rapssamen. Unsere primären Ziele sind daher die Isolierung von cDNAs für plastidäre und mikrosomale Oleatdesaturasen. Aufgrund der subzellulären Komplementation bei Desaturatedefekten ist damit zu rechnen, daß nur durch Ausschaltung aller Isoenzyme in Plastiden und ER der maximale Ölsäuregehalt erreicht werden kann. Die rapseigenen Gene sollen

als antisense-Konstrukte in geeigneten Vektoren zur Rapstransformation eingesetzt werden. Durch die Expression der spezifischen antisense-mRNAs wird die Desaturierung von Ölsäure blockiert, wodurch ein Rapsprototyp erhalten wird, der sich durch einen hohen Ölsäure- und niedrigen Linolensäuregehalt auszeichnet.

Wie unsere biochemischen und enzymatischen Studien zeigten, stellen die Fettsäuregruppen intakter Lipide ohne transienten Austausch die eigentlichen Substrate plastidärer (Schmidt & Heinz 1992, 1993) und mikrosomaler Oleatdesaturasen (Sperling et al. 1992, Sperling & Heinz 1993, Sperling et al. 1993) dar. Die plastidäre Oleatdesaturase aus Spinat wurde gereinigt und N-terminal sequenziert (Schmidt & Heinz 1992). Korrespondierende Oligonukleotide sollen über die PCR-Technik zur Isolierung einer cDNA aus mRNA führen. Die homologen Isoenzyme der Linoleatdesaturase aus Plastiden und Mikrosomen, die als erste pflanzliche Desaturasen sequenziert wurden (Arondel et al. 1992), zeigen eine unerwartet große Sequenzübereinstimmung. Aufgrund zu erwartender Homologien zwischen plastidärer und mikrosomaler Oleatdesaturase soll ein PCR-Screening zur Isolierung der homologen Rapssequenzen führen.

### **Isolierung von cDNA-Klonen für plastidäre und mikrosomale Oleatdesaturasen**

Zur Isolierung der für unser Vorhaben erforderlichen cDNA der plastidären Oleatdesaturase aus Spinat wurde das gereinigte Protein geblottet und N-terminal sequenziert. Von der resultierenden Aminosäuresequenz wurden degenerierte Oligonucleotidprimer für PCR-Experimente abgeleitet. Mit verschiedenen Primern wurde mittels 3'- und 5'-RACE ein vollständiger cDNA-Klon aus Spinatblatt-mRNA isoliert und sequenziert. Dieser cDNA-Klon besitzt eine Länge von 1717 bp sowie eine polyA-Sequenz und ein offenes Leseraster von 448 Aminosäuren. Diese