

**Genetische Modifikation von *SUPPRESSOR OF
OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1)*, *FRUITFULL (FUL)*
und weiterer Kandidatengene in Pappelhybriden (*Populus spec.*)**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer.-nat.

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Biologie

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Tobias Brüggemann

geboren am 10.06.1987 in Hamburg

Hamburg, 2016



*"There is no such thing as a "small experiment" when one works with poplars!
Beyond one-year of age the physiologically active crown
is above human reach, requiring towers or remote sensing."
Bradshaw et al. (2000)*

Tag der Disputation: 24. Februar 2017

Folgende Gutachter empfehlen die Annahme der Dissertation:

1. Gutachter: PD Dr. Matthias Fladung
Thünen-Institut für Forstgenetik, Genomforschung
2. Gutachter: Prof. Dr. Hans-Peter Mühlbach
Universität Hamburg, Molekulare Pflanzengenetik

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	6
Zusammenfassung	8
Abstract	9
1 Einleitung	10
1.1 Energieversorgung in Deutschland	10
1.1.1 Aktueller Energiemix	10
1.1.2 Energiewende	12
1.2 Biomasse als nachwachsender Rohstoff	12
1.2.1 Nachwachsende Rohstoffe	12
1.2.2 Pappeln in der Kurzumtriebswirtschaft	13
1.2.3 Zusammensetzung der pflanzlichen Biomasse	14
1.2.3.1 Cellulose	15
1.2.3.2 Lignin	15
1.2.3.3 Hemicellulosen	16
1.2.4 Globale Einordnung	17
1.3 Pappeln als Versuchspflanzen	17
1.3.1 Systematik der Gattung <i>Populus</i>	17
1.3.2 Hybridisierung	18
1.3.3 Ökologie und Verbreitung der Pappel	19
1.3.4 Verwendung von Pappelholz	20
1.3.4.1 Stoffliche Verwertung	20
1.3.4.2 Energetische Nutzung von Pappelholz	21
1.3.5 Die Pappel als Modellorganismus in der Molekularbiologie	21
1.4 Gentechnik bei Bäumen	23
1.4.1 Historische Einordnung	23
1.4.2 <i>Agrobacterium</i> -vermittelte Transformation	24
1.4.3 Gesellschaftliche Akzeptanz der Gentechnik und Sicherheitsforschung	24
1.4.4 Entwicklung von Nutzungsstrategien gentechnisch veränderter Bäume	26
1.5 Biomassebildung bei Pflanzen	29
1.5.1 Regulation der pflanzlichen Biomassebildung	29
1.5.2 Einfluss von <i>SOC1</i> und <i>FUL</i> auf die Biomassebildung	30
1.6 Kandidatengene	31
1.6.1 <i>SOC1</i> und <i>FUL</i> sind Schlüsselgene in der Blühzeitpunktregulation	31
1.6.2 <i>SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1)</i>	32
1.6.3 <i>FRUITFULL (FUL)</i>	33
1.6.4 Weitere Kandidatengene	34
1.7 Zielsetzung	35
2 Material und Methoden	36
2.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterial	36
2.2 Chemikalien	37
2.3 Pflanzenmaterial	37
2.3.1 Esch5	37
2.3.2 P1	38
2.4 Sterilisation von Gefäßen und Handwerkszeug	39
2.5 Gewebekultur	39
2.5.1 460-Medium	39
2.5.2 Medien 601, 601 _{1/2} und 601 _{1/4}	40

2.6	Transformationsvektoren	40
2.6.1	Agrobakterien	40
2.6.2	Transformationsplasmide	41
2.6.3	Eingesetzte Transformationsvektoren	41
2.6.4	Plasmid-Sequenzierungen	42
2.6.4.1	Transformationsvektor A122: pRT104-35S- <i>SOC1</i>	43
2.6.4.2	Transformationsvektor A137: pSH9-35S-Ful	45
2.7	<i>Agrobacterium</i>-Kulturen	46
2.7.1	Medien	46
2.7.1.1	YEB (Yeast Extract Broth)-Medium	46
2.7.1.2	LB (Lysogeny Broth)-Medium	46
2.7.1.3	Vorkultur-Medium für Transformationsvektoren des Stamms GV3101-pMP90RK	46
2.7.1.4	Vorkultur-Medium für Transformationsvektoren des Stamms EHA105	47
2.7.1.5	Vorkultur-Medium für die Transformationsvektoren A122 und A137	47
2.7.2	Glycerin-Stocks	47
2.7.3	Mini-Präparation von Plasmiden	47
2.8	Genetische Transformation	48
2.8.1	<i>Agrobacterium</i> -vermittelte Transformation von Pappeln	48
2.8.2	Entsorgung von genetisch verändertem Material und Dekontaminationsmaßnahmen	49
2.9	Extraktion von Nukleinsäuren	49
2.9.1	TE-Puffer	49
2.9.2	DNA-Extraktion	51
2.9.3	Spektralphotometrische Nukleinsäure-Konzentrationsmessung	51
2.9.4	RNA-Extraktion	51
2.9.4.1	Handprotokoll	51
2.9.4.2	RNA-Extraktionskit	52
2.9.5	DNase-Verdau der isolierten RNA	53
2.10	DNA-Analysen	53
2.10.1	Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis von Resistenzgenen	53
2.10.2	Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis der Zielgene	55
2.10.3	Gelelektrophorese	57
2.10.4	Southern Blot	57
2.10.5	„Stripping“	63
2.10.6	Synthese der Sonden für Southern Blots	63
2.10.7	TAIL-PCR zur Identifikation des Integrationsortes der T-DNA	65
2.11	Expressionsanalysen	67
2.11.1	Denaturierende Gelelektrophorese	67
2.11.2	RNA-Qualitätskontrolle am Bioanalyser	68
2.11.3	Reverse Transkription	69
2.11.3.1	SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit	69
2.11.3.2	InnuSCRIPT Reverse Transcriptase	69
2.11.4	Expressionsanalysen mittels semiquantitativer RT-PCR	69
2.11.5	Expressionsanalysen mittels qRT-PCR	69
2.11.6	Ermittlung der Referenzgene	70
2.12	Pappelkultur im Gewächshaus	73
2.12.1	Pflanzenschutz	75
2.12.2	Datenerhebung und statistische Auswertung	75
2.13	Holzanalysen	75
2.13.1	Holzchemische Analysen	75
2.13.2	Holzanatomische UMSP-Analysen	76
3	Ergebnisse	77
3.1	Genetische Modifikation der MADS Box-Gene <i>SOC1</i> und <i>FUL</i>	77
3.1.1	Genetische Modifikation von <i>SOC1</i>	77
3.1.1.1	Herunterregulation	77
3.1.1.2	Überexpression	82
3.1.2	Genetische Modifikation von <i>FUL</i>	84

3.1.2.1	Herunterregulation.....	84
3.1.2.2	Überexpression.....	88
3.1.3	Parallele genetische Modifikation von <i>SOC1</i> und <i>FUL</i>	89
3.1.3.1	Parallele Herunterregulation.....	89
3.1.3.2	Parallele Überexpression	95
3.2	Genetische Modifikation weiterer Kandidatengene.....	113
3.2.1	Genetische Modifikation von Potri.007G008600.....	113
3.2.1.1	Überexpression.....	113
3.2.1.2	Herunterregulation.....	116
3.2.2	Genetische Modifikation von Potri.002G034400.....	125
3.2.2.1	Überexpression.....	126
3.2.2.2	Herunterregulation.....	129
3.2.3	Genetische Modifikation von Potri.019G084600.....	143
3.2.3.1	Überexpression.....	144
3.2.3.2	Herunterregulation.....	148
3.2.4	Überexpression von Potri.005G123800	151
3.2.5	Genetische Modifikation von Potri.002G223100.....	157
3.2.5.1	Überexpression.....	157
3.2.5.2	Herunterregulation.....	159
3.3	Doppeltransformationen zur parallelen Überexpression von zwei Kandidatengenen.....	165
3.3.1	Potri.002G034400 und Potri.007G008600	165
3.3.2	Potri.002G034400 und Potri.002G223100	170
3.3.3	Potri.019G084600 und Potri.007G008600	175
4	Diskussion.....	179
4.1	Zielsetzung.....	179
4.2	Phänotypenänderungen durch genetische Transformationen von Xylem-exprimierten Kandidatengenen	179
4.2.1	Potri.007G008600.....	180
4.2.2	Potri.002G034400.....	180
4.2.3	Potri.019G084600.....	182
4.2.4	Potri.005G123800.....	183
4.2.5	Potri.002G223100.....	184
4.2.6	Doppeltransformationen.....	184
4.2.7	Fazit und Einordnung.....	185
4.3	Genetische Veränderungen von <i>SOC1</i> und <i>FUL</i>.....	187
4.3.1	Herunterregulation.....	187
4.3.2	Überexpression.....	190
4.3.3	Auffällige, doppeltransgene Phänotypen	190
4.3.4	Einordnung in den aktuellen Stand der Forschung zu <i>SOC1</i> und <i>FUL</i>	190
4.3.5	Hypothetische Erklärungsmodelle	192
4.4	Perspektive.....	193
4.4.1	Weiterentwicklung und Nutzung der Erkenntnisse	193
4.4.2	Aus den Ergebnissen abgeleitete evolutionäre Fragestellungen	194
5	Literatur	196
	Danksagungen.....	207
	Eidesstattliche Versicherung.....	209
A	Anhang	210
A.1	Kandidatengene.....	210
A.2	Sequenzen der Transformationsvektoren A122 und A137	211
A.2.1	Transformationsvektor A122	211
A.2.2	Transformationsvektor A137	214
A.3	Transformationsvektoren	217

Abkürzungsverzeichnis

Botanische Autorenkürzel (<http://ipni.org/index.html>, Zugriff am 07.06.2016)

ANDERSSON	Andersson, N. J.	MOENCH	Moench, C.
BARTRAM	Bartram, W.	OLIV.	Oliver, D.
E.VILM.	Vilmorin, E. d.	OLIVIER	Olivier, G.-A.
GAERTN.	Gärtner, J.	ROTH	Roth, A. W.
GRAY	Gray, A.	SM.	Smith, J. E.
HENRY	Henry, A.	T.ITÔ	Itô, T.
HEYNH.	Heynhold, G.	TORR.	Torrey, J.
L.	Linné, C. von	WESM.	Wesmael, A.
MICHX.	Michaux, F. A.	W.HILL	Hill, W.

Biologische und molekularbiologische Abkürzungen

35S	35S große RNA des Tabakmosaikvirus	<i>P.</i>	<i>Populus</i>
A	Adenin	p35S	35S-Promoter
A	<i>Agrobacterium</i> als Nummerierungszusatz	PANTHER	<i>Protein ANALYSIS THrough Evolutionary Relationships</i>
A.	<i>Arabidopsis</i> oder <i>Agrobacterium</i>	<i>Pc</i>	<i>Populus × canescens</i>
amiRNA	<i>artificial microRNA</i>	PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
ATP	Adenosintriphosphat	PFAM	<i>Protein FAMILies</i>
B.	<i>Brassica</i>	<i>Pt</i>	<i>Populus trichocarpa</i>
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>	qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	RB	<i>Right Border</i>
C	Cytosin	rDNA	ribosomale DNA
C	Cefotaxim	Rif	Rifampicin
CaMV	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i>	RIN	RNA Integrity Number
cDNA	Copy-DNA	RNA	Ribonukleinsäure
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	RNAi	RNA-Interferenz
cpDNA	chloroplastidäre DNA	ROX	Rhodamin X
Ct	<i>Cycle threshold</i>	rRNA	ribosomale RNA
DIG	Digoxygenin	RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
DNA	Desoxyribonukleinsäure	SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	Spec	Spectinomycin
EC	<i>Enzyme Commission</i>	spec.	(verschiedene) Arten einer Gattung
EST	<i>expressed sequence tag</i>	SSR	<i>Simple Sequence Repeat</i>
F.	<i>Fragaria</i>	ssRNA	einzelsträngige RNA
G	Guanin	Str	Streptomycin
gDNA	genomische DNA	T	Thymin
Gent	Gentamicin	TAIL-PCR	<i>Thermal asymmetric interlaced PCR</i>
H	Hygromycin	T-DNA	Transfer-DNA
H ₂ O	Wasser	Ti-Plasmid	Tumor-induzierendes Plasmid
HPT	Hygromycinphosphotransferase	UDP	Uridindiphosphat
K	Kanamycin	UMSP	<i>Universal-Microscope-Spectrophotometer</i>
Kan	Kanamycin	UTR	untranslatierte Region
LB	<i>Left Border</i>	WPM	Woody Plant Medium
LB	Lysogeny Broth	WT	Wildtyp
N	laufende Transformationsnummer	YEB	Yeast Extract Broth
NAA	1-Naphthyllessigsäure		
NPTII	Neomycinphosphotransferase II		
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm		

Chemikalien

ATMAB	Alkyltrimethylammoniumbromid	MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
CSPD	Dinatrium-3-(4-methoxy Spiro[1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)tricyclodecan]-4-yl)phenylphosphat	Na-Citrat	Natriumcitrat
DEPC	Diethylpyrocarbonat	PVP	Polyvinylpyrrolidon
DMSO	Dimethylsulfoxid	SDS	Natriumdodecylsulfat
DTT	Dithiothreitol	SSC	Natrium/Natriumcitrat (<i>Sodium/Sodiumcitrate</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	SSTE	Natriumdodecylsulfat-Tris-HCl-EDTA
HPLC-H ₂ O	Wasser für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>High-performance liquid chromatography</i>)	TBE	Tris-Borat-EDTA
		TE	Tris-HCl-EDTA

Technische und mathematische Abkürzungen sowie Einheiten

°C	Grad Celsius	mL	Milliliter
°dH	Grad deutscher Härte	mM	Millimolar
μE	Mikroeinstein	Mrd.	Milliarden
μL	Mikroliter	ms	Millisekunde(n)
μM	Mikrometer	ng	Nanogramm
bp	Basenpaar(e)	nt	Nukleotid(e)
cm	Centimeter	p	Irrtumswahrscheinlichkeit für signifikante Abweichung
<i>g</i>	Erdbeschleunigung	pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
g	Gramm	r	Radius
h	Stunde(n)	RCF	relative Zentrifugalkraft
ha	Hektar	rpm	Umdrehungen pro Minute
Hz	Hertz	s	Sekunde(n)
kg	Kilogramm	s	Standardabweichung
kWh	Kilowattstunden	t	Tonne(n)
L	Liter	T _A	<i>Annealing</i> -Temperatur
m	Meter	TWh	Terawattstunden
M	Mittelwert oder Molar/mol pro Liter	U	Einheiten (Units)
mg	Milligramm	UV	ultraviolett
min	Minute(n)	V	Volt
Mio.	Millionen		
MJ	Megajoules		
mJ	Millijoules		

Sonstige Abkürzungen

♂	männlich	KUP	Kurzumtriebsplantage
♀	weiblich	NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
∞	unendlich	NL	Niederlande
Abb.	Abbildung	NREL	<i>National Renewable Energy Laboratory</i>
abs.	absolut (100%)	PD	Privatdozent
ad.	auffüllen auf	pers.	persönlich
bzw.	beziehungsweise	Prof.	Professor
ca.	circa	RT	Raumtemperatur
d. h.	das heißt	Tab.	Tabelle
Dr.	Doktor	u. a.	unter anderen/m
<i>et al.</i>	und andere	UMSP	<i>UV microspectrophotometry</i>
Fa.	Firma	USA	Vereinigte Staaten von Amerika
FAO	Welternährungsorganisation	USB	<i>unoriented strand board</i>
IAP	Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung	VOC	<i>volatile organic compound</i>
INRA	<i>Institut national de la recherche agronomique</i>	w/v	Gewicht/Volumen
inkl.	inklusive	z. B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Nachwachsende Rohstoffe sind ein essentieller Bestandteil der Energiewende und bergen ein großes Potential für die Energiegewinnung. Der nachwachsende Energieträger „Biomasse“ kann unter anderem aus Pappeln gewonnen werden, die auf Kurzumtriebsplantagen angepflanzt werden. Das so produzierte Holz kann als Festbrennstoff genutzt oder nach technischen Optimierungen auch in biogene Flüssigkraftstoffe umgewandelt werden. Das Potential der für die Biomassegewinnung eingesetzten Pappelklone ist allerdings in Hinblick auf hohe Holzerträge bisher nicht ausgeschöpft. Durch gentechnische Ansätze sollte die Biomasseproduktion der Pappel beeinflusst und im Idealfall gesteigert werden. Da jedoch momentan ein kommerzieller Anbau von gentechnisch modifizierten Pappeln in Deutschland nicht möglich ist, liegt die Bedeutung der in dieser Arbeit erhaltenen Erkenntnisse in der Identifizierung von Kandidatengen, die für eine beschleunigte, zielorientierte Pappelzüchtung Anwendung finden können.

Grundlage für die Auswahl der Kandidatengene war die Beobachtung von Melzer *et al.* (2008), dass die beiden Blütengene *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1)* und *FRUITFULL (FUL)* bei parallelem *Knockout* in *Arabidopsis* sekundäres Dickenwachstum und Holzbildung auslösten. Neben diesen beiden Kandidatengen wurden fünf weitere, nur teilweise annotierte Gene bearbeitet, die sowohl im sich entwickelnden Xylem als auch in den Blüten oder in den Wurzeln der Pappel exprimiert wurden. Diese Kandidatengene wurden durch *Agrobacterium*-vermittelte Transformationen in Pappelhybriden konstitutiv überexprimiert bzw. mittels RNA-Interferenz herunterreguliert. Die 40 erhaltenen transgenen Linien wurden molekulargenetisch und auf signifikant abweichende Phänotypen untersucht. Von ausgewählten Linien wurde zusätzlich die Holzzusammensetzung und -anatomie analysiert.

Die Ergebnisse der fünf Xylem-exprimierten Kandidatengene waren inhomogen. Eine Veränderung des Phänotyps war nach Überexpression oder Herunterregulation des jeweiligen Kandidatengens nicht konsistent zu erzielen, dennoch wurden sowohl transgene Linien mit signifikant gesteigertem oder reduziertem Wachstum erhalten. Von diesen Pflanzen soll das Wachstum unter standardisierten Bedingungen validiert sowie die Expression von Genen der Biomassesynthesewege untersucht werden.

Dagegen wiesen drei unabhängig erzeugte, transgene Pappellinien, in denen *SOC1* und *FUL* parallel überexprimiert wurden, einen stark beeinflussten Phänotyp mit deutlich reduzierter Pflanzenhöhe, sowie bei einem besonders intensiven Phänotyp veränderte Blätter und fragile Wurzeln auf. Die Überexpression von nur einem dieser Gene blieb unterdessen unauffällig, ebenso die einzelne und parallele Herabregulierung von *SOC1* und *FUL*. Zur Erklärung der erhaltenen Ergebnisse nach der genetischen Modifikation von *SOC1* und *FUL* wurden zwei Hypothesen entwickelt. Ihre Überprüfung bietet Ansatzstellen für weitere Untersuchungen und genetische Veränderungen, die durch neue *Genome Editing*-Techniken auch Möglichkeiten für die spätere praktische Verwendung der Pappeln eröffnen würden.

Abstract

Renewable resources are an essential part of the German energy transition and hold great potential for energy production. Biomass can, for instance, be gathered from poplars grown on short rotation coppices. Their wood can be used as a solid fuel or as a fluid fuel after technical improvement. The potential of the applied poplar clones with regard to high wood yield has not yet been exhausted. The biomass production of poplars should ideally be modified and increased using biotechnological approaches. Since there are no plantations of genetically modified poplars in Germany the results of this thesis can serve candidate genes for conventional breeding. Thus, poplar breeding can be performed both faster and more target-oriented. Background for the selection of candidate genes was a publication by Melzer *et al.* (2008). Here, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1)* and *FRUITFULL (FUL)* triggered secondary thickening and wood formation in *Arabidopsis* with a parallel knockout approach. Additionally to these two candidate genes, five other candidate genes were identified that were only partly annotated. These genes were expressed in poplar in developing xylem and in the catkins or the roots, respectively. The candidate genes were modified via *Agrobacterium*-mediated transformations for constitutive overexpression and knockdown by RNA interference. In total, 40 transgenic lines were examined on the molecular level and screened for significantly differing phenotypes. Selected lines were analysed regarding their wood composition and anatomy.

The results of the five xylem-expressing candidate genes were heterogeneous. Overexpression or downregulation did not consistently lead to aberrant phenotypes. However, several transgenic lines were produced with either significantly increased or decreased growth. These plants will be under further investigation concerning their growth under standardized conditions and possible changes in the expression of biomass-related genes.

Three independent transgenic lines with an overexpression of *SOC1* and *FUL* showed a strongly influenced phenotype with significantly reduced plant height. One extreme case is marked additionally by aberrant leaves and fragile roots. Overexpressing only one of both genes as well as the parallel downregulation of both *SOC1* and *FUL* remained unremarkable. To explain the yielded results after the genetic modification of *SOC1* and *FUL*, two hypotheses were developed. Their validation provides approaches for further considerations and genetic modifications which can be used to open new potential for subsequent application by the new genome editing techniques.

*Holzhackschnitzel*

1 Einleitung

1.1 Energieversorgung in Deutschland

1.1.1 Aktueller Energiemix

Ein divers zusammengesetzter Energiemix garantiert die Versorgungssicherheit Deutschlands. Sofern eine Energiequelle, möglicherweise auch zeitlich begrenzt, nicht verfügbar sein sollte, kann grundsätzlich die Energieversorgung des Landes aufrecht erhalten werden. Dies ist ein unerlässlicher Bestandteil für einen attraktiven Wirtschaftsstandort.

Im Jahr 2013 lag der Anteil von organisch-fossilen Energieträgern und Kernenergie am deutschen Endenergieverbrauch zusammen bei 87,7%. Die übrigen 12,3% der verbrauchten Energie in Deutschland stammten aus erneuerbaren Energien. Zur Energieerzeugung aus regenerativen Energieträgern werden Wasserkraft, Windkraft, Solarenergie und nachwachsende Rohstoffe genutzt (Abb. 1.1). Sie haben gemeinsam, dass ihre Energie direkt oder indirekt in der Sonnenstrahlung begründet ist. Ausnahmen sind hier lediglich Geothermie und Energie aus Gezeitenkraftwerke, die ebenfalls in die Gruppe der regenerativen Energieträger gehören. Sie nehmen mit einem Anteil von 0,4% am deutschen Endenergieverbrauch eine untergeordnete Rolle ein. Die nachwachsenden Rohstoffe tragen den Großteil zum regenerativen Energieanteil bei: Biomasse zur Wärme- und Stromerzeugung sowie Biokraftstoffe stellen zusammen etwa 62%. Das entspricht 7,6% des gesamten Endenergieverbrauchs (FNR 2014).

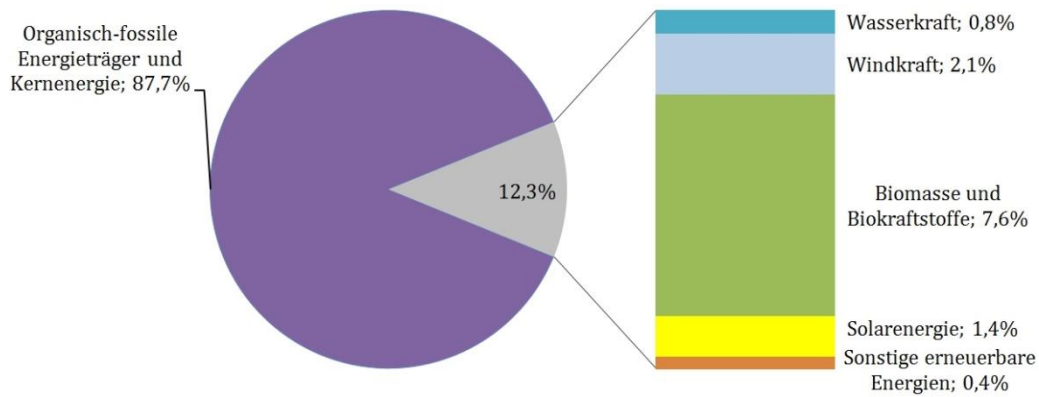


Abb. 1.1: Anteil der regenerativen Energiequellen am Endenergieverbrauch in Deutschland im Jahr 2013 (nach FNR 2014, Stand März 2014)

Der deutsche Endenergieverbrauch lag im Jahr 2013 insgesamt bei 2.590 TWh. Davon wurden 87,7% aus organisch-fossilen Energieträgern und der Kernenergie gewonnen. Erneuerbare Energien produzierten davon insgesamt 12,3%, wobei die Biomasse davon den größten Anteil trägt.

Die Bedeutung der Biomasse als Energieträger wird derzeit zwar nicht in der Stromerzeugung, allerdings bei der Wärmeerzeugung deutlich (Abb. 1.2). Nach Angaben des BMEL (2015) wird rund die Hälfte der verbrauchten Endenergie in Deutschland für die Wärmeerzeugung eingesetzt. Der Anteil der erneuerbaren Energien insgesamt am Wärmeverbrauch liegt bei 9,9%. Hiervon macht die Biomasse mit knapp 87% den größten Teil aus, was 113 Mrd. kWh entspricht (BMWi 2015). Geothermie und Solarthermie nehmen eine deutlich untergeordnete Rolle ein. Der Anteil der erneuerbaren Energien an der Wärmeerzeugung soll bis 2020 auf 14% gesteigert werden. Dazu werden auch dem Endverbraucher staatliche Fördermaßnahmen angeboten (BMEL 2015).

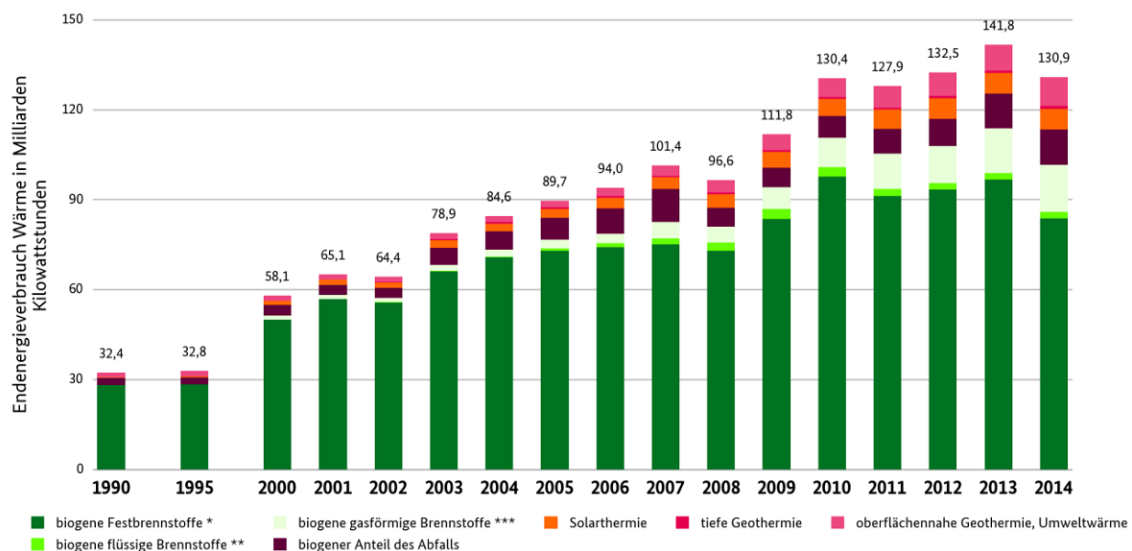


Abb. 1.2: Entwicklung des Wärmeverbrauchs aus erneuerbaren Energien in Deutschland (aus BMWi 2015)

Erneuerbare Energien steuern einen zunehmenden Teil an der Wärmebereitstellung in Deutschland bei. Im Jahr 2014 lag der Wert bei 130,9 Mrd. kWh. Der insgesamt niedrigere Wärmeverbrauch und niedrigere Anteil an biogenen Festbrennstoffen im Jahr 2014, die dem steigenden Langzeittrend widersprechen, werden auf die milde Witterung in diesem Jahr und den damit reduzierten Feuerholzverbrauch in Privathaushalten zurückgeführt (BMWi 2015). Zeichenerklärung: *) inkl. biogenem Anteil des Abfalls, ab 2013 inkl. Klärschlamm; **) inkl. Biodiesolverbrauch in der Landwirtschaft; ***) Biogas, Biomethan, Klär- und Deponiegas.

1.1.2 Energiewende

Der Begriff „Energiewende“ beschreibt den Übergang der Energieversorgung aus organisch-fossilen und nuklearen (mineralisch-fossilen) Energieträgern zu nachhaltig nutzbaren, regenerativen Energieträgern (http://www.bundesregierung.de/Webs/Breg/DE/Themen/Energiewende/EnergieLexikon/_function/glossar_catalog.html?nn=754402&lv2=754360&id=GlossarEntry772160, Zugriff am 09.06.2016). Der Ausstieg aus der Kernenergie ist ein bedeutender Bestandteil der bereits im Jahr 2010 beschlossenen Energiewende.

Während es in der deutschen Politik schon vielfach Anläufe zu einem Ausstieg aus der Kernenergie gab, wurde dieses Ziel mit der Mehrheit des Deutschen Bundestages nach den Nuklearunfällen im japanischen Kernkraftwerk „Fukushima Daiichi“ vereinbart (<http://www.bmwi.de/DE/Themen/Energie/Konventionelle-Energietraeger/uran-kernenergie.html>, Zugriff am 14.06.2016). Im Jahr 2011 ereignete sich vor der japanischen Ostküste ein schweres Seebeben, das einen Tsunami auslöste, der am 11. März 2011 auf die japanische Küste traf (USGS 2011). Im hier angesiedelten Kernkraftwerk Fukushima Daiichi kam es dadurch zu schweren nuklearen Unfällen (Stohl *et al.* 2012). Hiervon beeinflusste Diskussionen führten auf nationaler Ebene zu einem durch breite Teile der Gesellschaft getragenen Umdenken und der Abkehr von der Kernenergie, sodass am 30. Juli 2011 die sofortige Abschaltung von acht Kernkraftwerken und aller deutschen Kernkraftwerke bis zum Ende des Jahres 2022 vom Deutschen Bundestag verabschiedet wurde (Bundesanzeiger 2011).

Neben dem Atomausstieg ist ein weiteres zentrales Ziel der Energiewende in Deutschland die Steigerung des Anteils von erneuerbaren Energien am Gesamtstromverbrauch auf 80% bis zum Jahr 2050. Bis 2020 sollen 18% des Gesamtenergieverbrauchs von erneuerbaren Energien abgedeckt werden, bis 2050 sogar 65% (BMWi 2010). Ein weiteres Ziel der Energiewende ist die Reduktion von Treibhausgasen. Im Vergleich zum Stand von 1990 sollen die Treibhausgasemissionen bis 2020 um 40%, bis 2050 um 80% sinken (BMWi 2010).

1.2 Biomasse als nachwachsender Rohstoff

1.2.1 Nachwachsende Rohstoffe

Der Begriff „Nachwachsende Rohstoffe“ wird aufgrund verschiedener Ein- und Ausgrenzungen unterschiedlich definiert. Im Allgemeinen werden als nachwachsende Rohstoffe organische Rohstoffe angesehen, die land- oder forstwirtschaftlich produziert wurden und stofflich oder energetisch zur Wärme-, Strom- und Kraftstoffherzeugung verwendet werden (Diepenbrock 2014). Das unterscheidet sie von Nahrungs- oder Futtermitteln, die nicht inbegriffen werden (<http://fnr.de/nachwachsende-rohstoffe/ueberblick>, Zugriff am 09.08.2015). Eine weitere Definition nach Mann (1998) umfasst alle Stoffe, die aus lebender Materie stammen, um auch Syntheseprodukte von Bakterien und Mikroorganismen mit einzubeziehen.

Im Jahr 2015 wurden in Deutschland auf 2,47 Mio. Hektar nachwachsende Rohstoffe angebaut (FNR 2015 a). Davon entfallen rund 89% auf Energiepflanzen und 11% auf Industriepflanzen wie Ölpflanzen und Industriestärkelieferanten. Der Anteil der Energiepflanzen teilt sich auf in Quellen für Biogas (56%), Biodiesel (25%) und Bioethanol (7%). Auf 11.000 Hektar wurden Pflanzen angebaut, darunter auch Pappeln und Weiden, die als Festbrennstoffe genutzt werden, was einen Anteil von unter 1% ausmacht

(FNR 2015 a). Weitere Pflanzen, die als Festbrennstoffe energetisch verwertet werden können, sind Robinien (*Robinia spec. L.*), Miscanthus oder Chinaschilf (*Miscanthus spec. ANDERSSON*), Rutenhirse (*Panicum virgatum L.*), Rohrglanzgras (*Phalaris arundinacea L.*), Futtergräser (z. B. Weidelgras, Knautgras, Rohrschwengel, Glatthafer) und Getreideganzpflanzen (Kaltschmitt *et al.* 2009).

1.2.2 Pappeln in der Kurzumtriebswirtschaft

Pappelnutzholz wird vor allem auf Kurzumtriebsplantagen produziert. Kurzumtriebsplantagen sind Dauerkulturen von Bäumen auf landwirtschaftlichen Flächen, die nach festgelegten Umtriebszeiten bodennah beerntet werden (Diepenbrock 2014). Der erste Versuch zum Anbau von Pappeln in der Kurzumtriebskultur wurde 1976 im niedersächsischen Hann. Münden durchgeführt (FNR 2012).

Zum Anbau auf Kurzumtriebsplantagen sind in Deutschland nach Regelungen des Forstvermehrungsgutgesetzes 76 Pappelklone und Klonmischungen zugelassen (BLE 2012). In der Praxis werden hauptsächlich Schwarzpappeln der Sektion *Aigeiros* und Balsampappeln der Sektion *Tacamahaca* sowie ihre Hybriden verwendet (siehe Abschnitt 1.3.2 Hybridisierung). Klonmischungen werden verwendet, um die Resistenzeigenschaften der Bestände zu erhöhen und ihren Ertrag zu sichern (Diepenbrock 2014). Nach dem Bericht der nationalen Pappelkommission (BMELV 2012) wird in Deutschland eine Gesamtfläche von bis zu 6.000 ha für Kurzumtriebsplantagen genutzt.

Pappelplantagen werden mit ca. 20 cm langen Steckhölzern von einjährigen Trieben angelegt. Nach einer Wachstumszeit von drei bis 15 Jahren können die Pappeln maschinell bodennah beerntet werden. Sie treiben anschließend erneut aus (Hofmann 1998, Kauter *et al.* 2001, Stockmann *et al.* 2010). Die genaue Umtriebszeit richtet sich nach der vorgesehenen Nutzung des Holzes und den damit verbundenen ackerbaulichen Umständen, z. B. der Pflanzdichte (Stockmann *et al.* 2010). Ein zwei- bis vierjähriger Ernteturnus eignet sich für die Energieholzgewinnung, ein acht- bis 15-jähriger Ernteturnus für die Industrieholzgewinnung. Eine Beerntung zwischen diesen Zeiträumen ist aus ernte- und verwertungstechnischen Gründen nicht sinnvoll (Hofmann 1998). Die Umtriebszeit darf 20 Jahre nicht überschreiten, da die Fläche dann nach dem Bundeswaldgesetz als Waldfläche deklariert und das Rodungsverbot greifen würde (Diepenbrock 2014, FNR 2012).



Abb. 1.3: Ernte von Pappeln in der Kurzumtriebswirtschaft (K. Pfennig, Thünen-Institut für Forstgenetik)

Die Beerntung der Kurzumtriebsplantagen wird in der Regel nach drei bis sechs Jahren durchgeführt (Kauter *et al.* 2001). Spezielle Erntemaschinen ernten im Winterhalbjahr, wenn die Pappeln keine Blätter mehr tragen und idealerweise die Böden gefroren sind, die gesamten oberirdischen Teile der Pappeln und zerkleinern sie direkt vor Ort zu verarbeitungsfreundlichen Hackschnitzeln.

Einmal etabliert ist nur geringer Düngereinsatz auf Pappelplantagen nötig. Nach Ergebnissen von Düngeversuchen über einen zehnjährigen Zeitraum wurde bei Balsampappeln keine signifikante Zuwachssteigerung beobachtet. Die Stickstoffversorgung durch Remineralisierung des abfallenden Laubes sowie durch den atmosphärischen Eintrag waren ausreichend für die Versuchspflanzen. Dies liegt auch an der Mykorrhizierung von Pappeln: Durch die Symbiose mit Mykorrhiza-Pilzen wird zusätzlicher Stickstoff in die Pflanzenzellen gebracht. Die Stickstoffnutzung durch Endomykorrhiza soll auch die Holzbildung positiv beeinflussen (Szuba 2015). Ein ökologischer Vorteil ist, dass die Böden und das Grundwasser durch Verzicht auf künstlichen Düngereintrag nicht weiter mit Stickstoff belastet werden. Bei längerer Standzeit der Pappelplantage kann eine Kompensationsdüngung allerdings sinnvoll sein (Diepenbrock 2014, FNR 2012, BMELV 2012). Der Einsatz von Herbiziden vor der Pflanzung und in den ersten zwei Jahren der Etablierung ist zweckmäßig, ansonsten kann in der Regel darauf verzichtet werden (Stockmann *et al.* 2010, Hofmann 1998). Aufgrund der vergleichsweise geringen Standortansprüche eignen sich Pappeln auch für den Anbau auf ökologischen Grenzertragsstandorten. Wenn auch auf qualitativ hochwertigen Böden größere Erträge zu erwarten sind, ist bereits ab einer Bodenpunktzahl von 25-30 (maximale Bodenpunktzahl 100) der Pappelanbau bei ausreichender Wasserversorgung möglich (Kaltschmitt *et al.* 2009, Stockmann *et al.* 2010). Der hohe Wasserverbrauch ist im hohen Transpirationskoeffizienten von Pappeln begründet (Kaltschmitt *et al.* 2009). Ökologisch betrachtet sind Kurzumtriebsplantagen mit Pappeln eine sinnvolle Bereicherung der land- und forstwirtschaftlichen Flächen. Die lange Bodenruhe und reduzierte Bodenerosion wirken sich positiv auf die Bodenfruchtbarkeit aus. Auch Wildtiere und brütende Vögel finden hier ein Habitat, das während der Umtriebszeiten nicht angerührt wird, was einen positiven Einfluss auf die Biodiversität hat (Kaltschmitt *et al.* 2009, Yuan *et al.* 2008). Durch große Entfernung und schlechte Befahrbarkeit charakterisierte und unter kommerziellen Gesichtspunkten als Grenzertragsstandorte deklarierte Flächen könnten durch die hohe Umtriebszeit von Pappeln rentabel genutzt werden (Stockmann *et al.* 2010).

Bei der Verwendung des Holzes ist zu berücksichtigen, dass die frisch geerntete Biomasse einen Wassergehalt von bis zu 50% aufweist. Die Trocknung der Biomasse vor der Verwertung ist daher essentiell. Der Aschegehalt von Pappeln aus dem Kurzumtrieb liegt über dem von Waldholz bei 1,0-2,2% und wird insbesondere durch den höheren Rindenanteil beeinflusst (Diepenbrock 2014, Kaltschmitt *et al.* 2009).

1.2.3 Zusammensetzung der pflanzlichen Biomasse

Pflanzliche Biomasse setzt sich größtenteils aus den zwei Makromolekülen Cellulose und Lignin zusammen sowie der komplexen Gruppe der Hemicellulosen. In Bäumen handelt es sich bei der Biomasse vornehmlich um Holz. Das Holz von Pappeln besteht im Allgemeinen zu 43-50% aus Cellulose, 19-24% Lignin (Mansfield & Weineisen 2007) sowie 18-28% Xylanen und bis zu 5% Mannanen, die beide zu den Hemicellulosen gezählt werden (Mellerowicz *et al.* 2001). Das Holz einer sechs Monate alten Pflanze des bekannten Graupappel-Versuchsklons „INRA 717-1B4“, der auch in dieser Arbeit verwendet wurde, besteht zu 48,2% aus Cellulose, 20,7% aus Lignin und 30,7% aus Hemicellulosen (Lepié *et al.* 2007).

Holz entsteht während des sekundären Dickenwachstums, das Nacktsamer und holzige eudikotyle Pflanzen charakterisiert. Es resultiert aus dem lateralen meristematischem Gewebe, dem Kambium

(Raven *et al.* 2000). Das Kambium besteht modellhaft aus einer Schicht von initialen Meristemzellen und den Phloem- bzw. Xylemmutterzellen (Mellerowicz *et al.* 2001). Diese Zellschichten differenzieren nach innen in sekundäre Xylemzellen und nach außen in sekundäre Phloemzellen. Durch die nach innen abgespaltenen Xylemzellen verschiebt das Kambium sich selbst stets weiter nach außen. Die Xylemzellen bilden eine sekundäre Zellwand, anschließend setzen die Lignifizierung und im Allgemeinen der programmierte Zelltod ein (Mellerowicz *et al.* 2001). Die einsetzende Hydrolyse löst den Zellinhalt auf. Zurück bleibt ein Zellkorpus, der über einfache Öffnungen mit den benachbarten Gefäßzellen verbunden ist. Sie bilden zusammen die Leitgefäße für den Wassertransport (Groover *et al.* 2010).

1.2.3.1 Cellulose

Das Makromolekül Cellulose besteht aus β -1,4-glycosidisch verknüpften Cellubiose-Untereinheiten, die wiederum aus zwei D-Glucosemolekülen zusammengesetzt sind. Jedes Cellulose-Molekül besteht dabei aus 2.000-8.000 D-Glucoseeinheiten (Michal 1999) und bildet eine sogenannte Mikrofibrille. Sie liegen linear nebeneinander und sind über Wasserstoffbrücken miteinander verbunden, was durch die versetzte sterische Anordnung der Glucoseeinheiten begünstigt wird (Abb. 1.4). Auf molekularer Ebene wird Cellulose von Cellulose-Synthasen, die in der Zellmembran lokalisiert sind, aus UDP-D-Glucose erzeugt (Michal 1999). Cellulose ist mengenmäßig die häufigste organische Verbindung überhaupt (Purves *et al.* 2006, Michal 1999, Klemm *et al.* 2005): Rund 10^{12} - 15^{12} t Cellulose werden von pflanzlichen Organismen pro Jahr synthetisiert (Michal 1999, Lu *et al.* 2010).

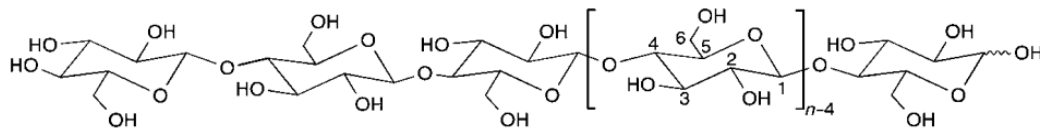


Abb. 1.4: Chemische Struktur von Cellulose (aus Klemm *et al.* 2005)

Cellulose besteht aus β -1,4-glycosidisch verknüpften Cellubiose-Einheiten. Deren Monomere sind D-Glucoseeinheiten, von denen insgesamt bis zu 2.000-8.000 Einheiten ein Cellulose-Molekül bilden (Michal 1999).

1.2.3.2 Lignin

Lignine sind sehr komplexe Moleküle, die aus drei unterschiedlichen Grundbausteinen, den Monolignolen *p*-Cumarylalkohol, Coniferylalkohol (auch Guaiacylalkohol, Groover *et al.* 2010) und Sinapylalkohol, zusammengesetzt sind (Mellerowicz *et al.* 2001). In Angiospermen werden vor allem Sinapyl- und Coniferylalkohol verwendet. Die genaue Zusammensetzung variiert allerdings nicht nur zwischen verschiedenen Laubbaumarten, sondern auch zwischen Geweben und Zelltypen und ist auch vom Entwicklungsstadium der Pflanze und von Umwelteinflüssen abhängig (Mellerowicz *et al.* 2001). Die Synthese des Lignins durch Polymerisierung der Monolignole findet extrazellulär statt (Michal 1999, Heldt & Piechulla 2008).

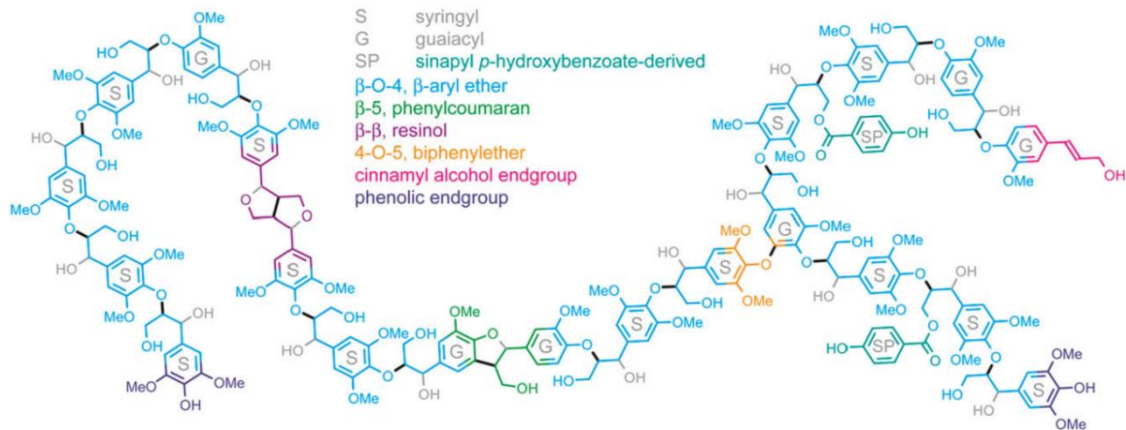


Abb. 1.5: Chemische Zusammensetzung von Lignin aus der Pappel (aus Vanholme *et al.* 2010)

In Pappelholz und Angiospermen im Allgemeinen dominieren Syringyl- (S) und Guaiacylalkohol (G) in der Struktur von Lignin. Sinapylalkohole (SP) nehmen eine untergeordnete Rolle ein.

Lignin verleiht dem Holz Stabilität. Als eine Art Klebstoff wird Lignin in die Zellwände eingelagert und bindet kovalent mit den Cellulosefibrillen in den Zellwänden (Heldt & Piechulla 2008, Kaltschmitt *et al.* 2009). Darüber hinaus dient das Molekül der Pathogenabwehr und wird bei Gewebeerwundung gebildet (Fladung 2011, Heldt & Piechulla 2008). Durch seine Festigkeit wird Holz durch Herbivoren, Bakterien und Pilze nur langsam abgebaut (Heldt & Piechulla 2008).

1.2.3.3 Hemicellulosen

Unter dem Begriff Hemicellulosen sind im Allgemeinen unterschiedliche Polysaccharide zusammengefasst, die in der pflanzlichen Biomasse vorkommen. Hier ist zwischen Pectinen und den eigentlichen Hemicellulosen zu unterscheiden, die aus β -1,4-glycosidisch verknüpfter Glucose, Mannose oder Xylose in äquatorialer Konfiguration bestehen und alkalisch extrahiert werden können. Pectine weisen teilweise eine β -1,4-glycosidische Bindung in axialer Konfiguration auf und können in saurem Milieu extrahiert werden (Scheller & Ulvskov 2010). Im Folgenden werden Pectine und die Hemicellulosen im engeren Sinne zusammen betrachtet. Die häufigsten Hemicellulosen in der sekundären Zellwand sind Xylane, speziell *O*-acetyl-(4-*O*-methylglucurono)-xylan, die in Pappelholz 18-28% des Trockengewichts ausmachen (Groover *et al.* 2010, Saha 2003, Mellerowicz *et al.* 2001). Sie gehören wie Arabinose zu den Pentosen. Weiterhin werden Hexosen wie Mannose, Glucose oder Galactose sowie Zuckersäuren zu den Hemicellulosen gezählt. Die genaue Zusammensetzung der Hemicellulosen unterscheidet sich zwischen verschiedenen Baumarten und Gewebetypen. Während in Harthölzern eher Xylane vorkommen, dominieren in Weichhölzern Glucomannane (Saha 2003, Scheller & Ulvskov 2010). In der Pflanze verbinden Hemicellulosen die Cellulose-Mikrofibrillen. Beispielsweise stärken Xylane dadurch die sekundäre Zellwand und haben somit durch ihre Funktion im Xylem, wie in Xylan-defizienten Mutanten gezeigt wurde, einen Einfluss auf den Wassertransport. Auch bei der Gewinnung biogener Kraftstoffe sind Hemicellulosen von Bedeutung. Sie beeinträchtigen negativ die Saccharifizierung der Lignocellulose, darüber hinaus sind insbesondere die Pentosen für die Fermentation unerwünscht (Scheller & Ulvskov 2010).

1.2.4 Globale Einordnung

Grundsätzliche Anstrengungen im Bereich der nachwachsenden Rohstoffe sind aufgrund der prognostizierten globalen Entwicklung notwendig. Schätzungen zu Folge steigt die Weltbevölkerung bis 2050 auf 7,7 bis 10,6 Mrd. Menschen an (Kaltschmitt *et al.* 2009). Unter vielen sozioökonomischen Herausforderungen stellen die Ernährungssicherheit und die Energieversorgung der anwachsenden Weltbevölkerung drängende Probleme dar. Ohnehin ist die Nahrungsmittelverteilung auf der Welt bereits jetzt unausgewogen und teilweise unzureichend.

Um die Nahrungsmittelversorgung der Weltbevölkerung sicherzustellen, ist ein erhöhter Agrarflächenbedarf von 25-70% erforderlich (Kaltschmitt *et al.* 2009). Bei Angleichung der Ernährungsgewohnheiten der Entwicklungsländer an den Standard der Industrienationen, was einen insgesamt höheren Pro-Kopf-Verbrauch und eine Zunahme von tierischen Lebensmitteln bedeutet, steigt der Flächenbedarf um 18-28% (Kaltschmitt *et al.* 2009). Eine Steigerung der Erträge pro Flächeneinheit ist nur durch effektive Pflanzzüchtung und technische Fortschritte möglich.

Neben steigendem Bedarf sinkt allerdings auch die verfügbare Fläche, beispielsweise durch Bodendegradation. Durch Wind und Wasser verursachte Erosion sowie Versalzungen reduzieren die verfügbare Agrarfläche um bis zu 5% bis zum Jahr 2050 (Kaltschmitt *et al.* 2009).

Auch die sogenannte „Tank-oder-Teller-Diskussion“ sollte bei der Produktion von nachwachsenden Rohstoffen berücksichtigt werden. Kritiker der Bioenergiegewinnung befürchten, dass wertvolle Lebensmittel zu Energieträgern weiterverarbeitet werden, anstatt dass sie zur Ernährung dienen. Ebenso könnte es zur Flächenkonkurrenz zwischen Lebensmittel- und Biomasseproduktion kommen (Yuan *et al.* 2008). Dies würde mit dem Anbau von Lignocelluloseproduzenten wie Pappeln reduziert werden, da sie auch auf Grenzertragsstandorten, die für die Lebensmittelproduktion nicht in Frage kommen, angebaut werden können (BMELV 2012).

1.3 Pappeln als Versuchspflanzen

1.3.1 Systematik der Gattung *Populus*

Die Gattung der Pappeln *Populus* L. gehört mit ihrer Schwestergattung *Salix* L. (Weiden) in die Familie der *Salicaceae* (Weidengewächse) (Abb. 1.6). Die Linien *Populus* und *Salix* trennten sich vor etwa 60 bis 65 Mio. Jahren, bereits vor etwa 100 bis 120 Mio. Jahren die Linien der Gattungen *Populus* und *Arabidopsis* (Tuskan *et al.* 2006).

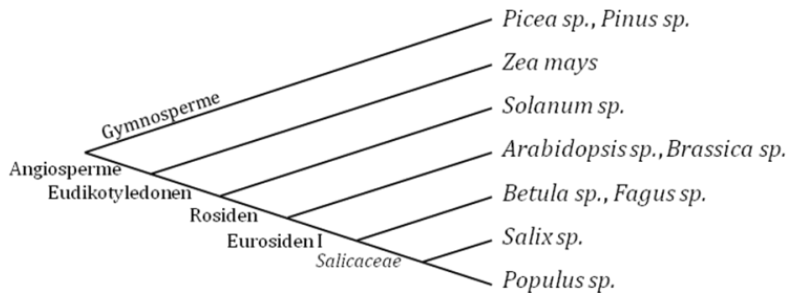


Abb. 1.6: Externe Systematik der Gattung *Populus* mit ausgewählten, wichtigen Pflanzengruppen

Die Gattung *Populus* ist neben der Gattung *Salix* Bestandteil der *Salicaceae*. Sie werden eingeordnet in die Eurosiden I, während die Modellpflanze *Arabidopsis spec.* zu den Eurosiden II gehört. Ihre gemeinsame Gruppe sind die Rosiden (Brunner & Nilsson 2004), die den eudikotyledonen Pflanzen untergeordnet sind. Sie alle sind bedecktsamige Pflanzen (Angiosperme, auch Magnoliopsida), die sich von den nacktsamigen Pflanzen (Gymnospermen), u. a. mit den Koniferen, abgrenzen lassen. Die Zuordnung im Kladogramm basiert auf der Sequenzdatenbank Phytozome Tree 10 (<https://phytozome.jgi.doe.gov>, Stand 09.08.2015), Bradshaw *et al.* (2000) sowie Jansson & Douglas (2007). Die Abbildung gibt keine Information über den Zeitrahmen der evolutionären Differenzierung.

Sechs Sektionen unterteilen die Gattung *Populus*: *Abaso*, *Aigeiros* (Schwarzpappeln), *Leucoides*, *Populus* (ehemals *Leuce*; Espen und Weißpappeln), *Tacamahaca* (Balsampappeln) und *Turanga* (Abb. 1.7). Bei den Sektionen handelt es sich um unter morphologischen und ökologischen Aspekten abgegrenzte Gruppen. Die Definition der verschiedenen Arten sowie die Zuordnung der Arten in die jeweiligen Sektionen werden in einigen Fällen diskutiert (Eckenwalder 1996). Die Anzahl der Arten, die insgesamt der Gattung *Populus* zugeschrieben werden, variiert in der Literatur zwischen 22 und 85, da einige Hybriden manchmal als eigene Art definiert werden. Im gebräuchlichen Standardwerk von Eckenwalder (1996) werden 29 Arten benannt.

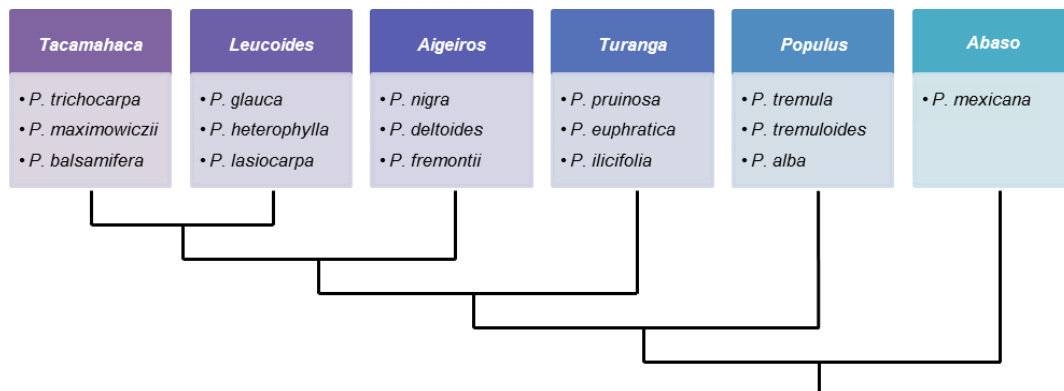


Abb. 1.7: Interne Systematik der Gattung *Populus* (aus Brüggemann 2011)

Die Gattung *Populus* teilt sich in sechs Sektionen auf. Die in dieser Arbeit verwendeten Hybriden *P. × canescens* sowie *P. tremula × P. tremuloides* gehören der Sektion *Populus* an. Die erste verfügbare Genomsequenz stammte vom Klon Nisqually-1 der Art *P. trichocarpa*. Dies ist ein Vertreter der kommerziell bedeutenden Sektion *Tacamahaca*. Die phylogenetisch älteste Art *P. mexicana* ist das einzige Glied der Sektion *Abaso*, die am basalen Ende der Gattung steht und hohe Ähnlichkeit zur Schwestergattung *Salix* aufweist (Eckenwalder 1996).

1.3.2 Hybridisierung

Hybridisierung kann in der Regel sektionsintern auftreten, in einigen Fällen auch intersektionell (Willing & Pryor 1976, Abb. 1.8). Die Kreuzung natürlicherweise inkompatibler Arten erfordert spezielle

Techniken (DiFazio *et al.* 2011). Alle Pappelarten sind natürlicherweise diploid und besitzen 19 Chromosomen. Ihre Hybriden sind fertil (Blackburn & Harrison 1924, Bradshaw *et al.* 2000).

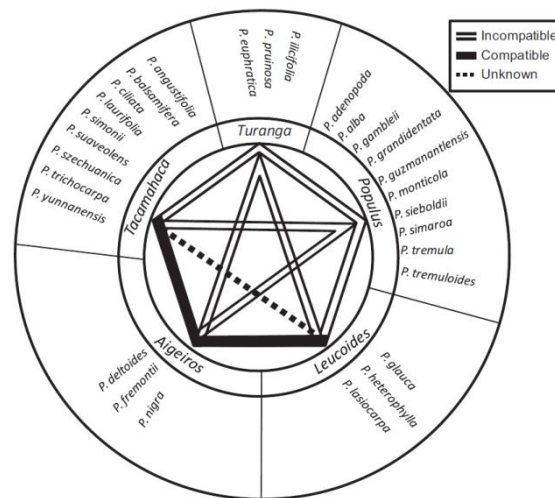


Abb. 1.8: Interspezifische Kreuzbarkeit der Gattung *Populus* (nach Willing & Pryor 1976, aus DiFazio *et al.* 2011)

Innerhalb der Gattung *Populus* lassen sich die Arten einiger Sektionen auf natürlichem Wege miteinander kreuzen. Pappeln der Sektion *Aigeiros* lassen sich mit Vertretern von *Tacamahaca* und *Leucoides* hybridisieren. Die Kompatibilität zwischen *Tacamahaca* und *Leucoides* ist nicht abschließend geklärt (DiFazio *et al.* 2011).

Eine sektionsinterne, natürlich entstandene Hybride ist die Graupappel *P. × canescens* SM. Obwohl üblicherweise als *P. tremula × P. alba* bezeichnet (z. B. in Eckenwalder 1996 oder Cervera *et al.* 2005), existieren auch Hybriden in der gegensätzlichen Kreuzungsrichtung *P. alba × P. tremula* (Rajora & Dancik 1992). Insgesamt entstand *P. × canescens* wahrscheinlich mehrfach im Überlappungsgebiet der beiden Elternarten, was auch durch frühzeitliche, anthropogene Verbreitung der Elternarten vorangetrieben wurde (Eckenwalder 1996). Der in dieser Arbeit verwendete Versuchsklon der Art *P. × canescens* ist nachweislich ein Hybrid mit der Kreuzungsrichtung *P. tremula × P. alba* (Lepié *et al.* 1992, M. Fladung, Thünen-Institut für Forstgenetik, persönliche Mitteilung).

Die Hybridzüchtung ist bedeutsam für die forstwirtschaftliche Nutzung der Pappel. Bei Schwarzpappelhybriden wurde ein ausgeprägter Heterosiseffekt beobachtet, wodurch sie in ihrer Wüchsigkeit die Elternarten übersteigen. Auch bei Espenhybriden übersteigt der durchschnittliche Zuwachs den ihrer Elternarten (Kauter *et al.* 2001).

1.3.3 Ökologie und Verbreitung der Pappel

Pappeln sind zweihäusige, perennierende Pflanzen (Eckenwalder 1996). Abgesehen von z. B. durch Pfropfung hergestellte Einzelindividuen, ist *Populus lasiocarpa* OLIV. (Chinesische Großblatt-Pappel) die einzige einhäusige Pappel (Cervera *et al.* 2005). Die männlichen und weiblichen Blüten sind in Kätzchen zusammengefasst, die in der Regel vor der sommergrünen Belaubung ausgeprägt werden. Der Pollen der Pappeln wird durch den Wind verbreitet (Anemophilie), ebenso die entstandenen Samen (Anemochorie) (Eckenwalder 1996). Neben der sexuellen Vermehrung ist bei vielen Pappelarten auch die vegetative Ausbreitung durch Bewurzeln von Steckhölzern und bei Espen und Weißpappeln durch Ausbildung von Wurzelbrut möglich. In der Sektion *Tacamahaca* wurde Cladoptose beobachtet, also das gezielte Abwerfen

von Ästen, die dann verbreitet werden und anwachsen können (Bradshaw *et al.* 2000, DiFazio *et al.* 2011). Durch ihr schnelles Wachstum und die einfachen, asexuellen Reproduktionsmechanismen gehören die Pappeln zu den Pionierpflanzen (Eckenwalder 1996).

Grundsätzlich sind Pappeln auf der nördlichen Erdhemisphäre endemisch. Wie in Willing & Pryor (1976) und IPC (2004) aufgeführt, finden sich anthropogene Pappel-Anpflanzungen auch in der südlichen Hemisphäre, insbesondere in Argentinien (63.500 ha), Chile (15.000 ha), aber auch in Südafrika, Australien und Neuseeland.

Die Arten der Sektion *Populus* haben ihren Verbreitungsschwerpunkt im Mittelmeerraum und dem westlichen Asien (*P. alba* L.) bzw. im eurasischen (*P. tremula* L.) und nordamerikanischen Raum (*P. tremuloides* MICHX.). Es handelt sich vorwiegend um Waldbäume (Kauter *et al.* 2001). Die Schwarzpappel *P. nigra* L. ist die eurasische Hauptart der Sektion *Aigeiros* (Schwarzpappeln). Ihr Verbreitungsgebiet liegt im Mittelmeerraum, Mitteleuropa und Asien. *P. nigra* ist ein ausgesprochener Pionierbaum (Kauter *et al.* 2001). Die Arten der Balsampappeln (Sektion *Tacamahaca*) sind natürlicherweise in Amerika und Asien verbreitet. Die bedeutendste Art Nordamerikas ist *P. trichocarpa* TORR. & GRAY, in Asien *P. maximowiczii* HENRY. Es handelt sich um die Pappeln mit dem ausgeprägtesten Waldbaumcharakter (Kauter *et al.* 2001).

Die drei weiteren Sektionen *Turanga*, *Leucoides* und *Abaso* nehmen eine kommerziell untergeordnete Rolle ein (Kauter *et al.* 2001). Der Hauptvertreter der Sektion *Turanga*, *P. euphratica* OLIVIER, ist von Zentralasien bis nach Nordafrika verbreitet (Eckenwalder 1996); Pappeln der Sektion *Leucoides* in China und im Osten der USA (*P. heterophylla* L.) (Eckenwalder 1996, Kauter *et al.* 2001). Die Sektion *Abaso*, mit ihrer einzigen Art *P. mexicana* WESM., ist ausschließlich in Mexiko anzutreffen (DiFazio *et al.* 2011).

1.3.4 Verwendung von Pappelholz

1.3.4.1 Stoffliche Verwertung

Pappelholz ist ein wichtiger Rohstoff für die Papier- und Zellstoffindustrie, wobei hier die Nutzung der Cellulose im Vordergrund steht (Hofmann 2002). Das Holz kann als Bauholz zum Innenausbau und zerkleinert für die Produktion von Span- und Faserplatten verwendet werden (Bradshaw *et al.* 2000). Hier bestehen auch neue Ansätze für USB-Platten (kurz für englisch *unoriented strand boards*, FNR 2015 b). Dabei handelt es sich um Faserplatten, die im Gegensatz zu Bauholz von Koniferen keine volatilen organischen Bestandteile (englisch VOCs/*volatile organic compounds*) abgeben. Als emissionsfreies Holz wird die Pappel auch zu Holzwole oder Holzspänen für die Kleintierhaltung verarbeitet. Durch den geringen Anteil an ätherischen Ölen ist Pappelholz weniger leicht entzündlich als viele andere heimische Hölzer und somit für die Streichhölzerproduktion besonders geeignet (Bradshaw *et al.* 2000). Ein neues Einsatzgebiet für Pappeln entsteht im Bereich der Phytoremediation von Umweltgiften (Fladung 2011). Neben Weiden sind sie hierfür durch ihr schnelles Wachstum, tiefgehende Wurzeln und die hohe Wasseraufnahme ideal geeignet. Die Bäume nehmen Düngerrückstände, anorganische Metalle, organische Substanzen wie Kraftstoffe, Lösungsmittel und Pestizide sowie lösliche Radionuklide auf (Licht & Isebrands 2005).

Neben diesen modernen Nutzungswegen wird und wurde das weiche Pappelholz für die Korpusse von Musikinstrumenten und Renaissancegemälden, vor allem aus Italien, genutzt. Beispielsweise wurde das am Anfang des 16. Jahrhunderts gemalte Ölgemälde „Mona Lisa“ von Leonardo da Vinci auf einer Pappelholztafel gemalt. Auch für naturmedizinische Zwecke wird auf die Pappel zurückgegriffen. Den in vielen Pflanzenteilen enthaltenen phenolischen Verbindungen wird eine heilende Wirkung bei oberflächlicher Anwendung oder als Teeaufguss zugeschrieben (Weisgerber 2006).

1.3.4.2 Energetische Nutzung von Pappelholz

Der größte Anteil des Pappelholzes, das energetisch verwendet werden soll, wird in der Regel der thermischen Verwertung zugeführt. Der Brennwert von Holz im Allgemeinen liegt bei 19 MJ/kg Trockenmasse, von Pappelholz nach Kaltschmitt *et al.* (2009) sogar mit 19,8 MJ/kg noch etwas darüber. Der Brennwert von Stroh und *Miscanthus* liegt mit jeweils 18 MJ/kg darunter. Lediglich verarbeitete Produkte aus nachwachsenden Rohstoffen wie Bioethanol (27 MJ/kg) und Rapsöl (37 MJ/kg) erreichen höhere Werte (FNR 2005).

Pappelholz wird als Energieträger in Form von Holzhackschnitzeln oder weiterverarbeitet als Holzpellets genutzt. Im Jahr 2014 wurden 1,8 Mio. Tonnen Holzpellets in Deutschland verbraucht (BMWi 2015). Die Nutzung von Biomasseheizungen, die mit Holzpellets, Hackschnitzeln oder Scheitholz befeuert werden, wird in Deutschland staatlich gefördert (BMEL 2015).

Die Cellulose aus dem Holz kann durch Hydrolyse in einfache Saccharide aufgespalten werden, die dann zur Fermentation zu Bioethanol genutzt werden können. In Bäumen ist die zur Fermentation nutzbare Cellulose allerdings in einer Matrix aus anderen Polysacchariden und Lignin eingebettet. Diese Stoffe stören die Hydrolyse der Cellulose (Lu *et al.* 2010, Van Acker *et al.* 2013). Momentan ist dadurch der massive Einsatz von aggressiven Chemikalien nötig, was sich in den Kosten niederschlägt und stark umweltbedenklich ist (Yuan *et al.* 2008, Fladung 2013). Daher ist Holz nach derzeitigem Stand noch keine signifikante Quelle für Bioethanol, sondern vielmehr die Saccharide aus Zuckerrohr oder Mais (Nieminen *et al.* 2012). Die Wettbewerbsfähigkeit von Bioethanol aus der Lignocelluloseproduktion hängt im starken Maße davon ab, ob durch weitere Forschungen die Effektivität der Verarbeitung gesteigert und letztlich dadurch die Kosten gesenkt werden können. Wenn dies gelingt, stellt Lignocellulose-Biomasse die beste Wahl zur Bioethanolproduktion in gemäßigten Klimazonen dar (Yuan *et al.* 2008).

1.3.5 Die Pappel als Modellorganismus in der Molekularbiologie

Nachdem an *Arabidopsis* und anderen krautigen Pflanzen erfolgreich genetische Transformationen durchgeführt wurden, bestand auch Bedarf an einer Modellbaumart. Die erste Transformation von Pappeln gelang 1986 von Parsons *et al.* (1986). In Kombination mit der verhältnismäßig einfachen vegetativen Vermehrung etablierten sich Pappeln als Modellorganismen im Bereich der Forstgenetik (Ellis *et al.* 2010). Modellorganismen in dieser vorliegenden Studie waren die Hybridaspe Esch5 (*P. tremula* × *P. tremuloides*, Fladung *et al.* 1997) und die Graupappel INRA 717-1B4 (*P.* × *canescens*, Leple *et al.* 1992).

Genomsequenzdaten

Pappeln sind diploide Organismen mit 19 Chromosomen (Tuskan *et al.* 2006). Ihr Genom ist mit 480 bis 550 Mio. Basenpaaren lediglich etwa viermal größer als das von *Arabidopsis* und vierzigmal kleiner als das Genom von *Pinus taeda* L. (Bradshaw *et al.* 2000, Tuskan *et al.* 2006, Abb. 1.6). Im Laufe der Evolution erlebte das Genom der modernen Pappeln zwei Duplikationsereignisse: Vor etwa 60-65 Mio. Jahre wird die salicoide Genomduplikation datiert, die bei der Pappel 92% des Genoms betraf (Tuskan *et al.* 2006). Noch vor der Trennung der Gattungen *Populus* und *Arabidopsis* (L.) HEYNH. vor etwa 100 bis 120 Mio. Jahren kam es bereits zu einer ersten Genomduplikation, die den gemeinsamen Vorfahren betraf. Rund 59% des Pappelgenoms ist davon beeinflusst. Durch diese frühe und die salicoide Genomduplikation liegen in der Pappel einige Genomregionen in vierfacher Kopie vor (Tuskan *et al.* 2006).

Die amerikanische Balsampappel *P. trichocarpa* (Klon Nisqually-1) war die erste sequenzierte Baumart (Tuskan *et al.* 2006) und erst die dritte sequenzierte Pflanzenart überhaupt (Ellis *et al.* 2010). Die Anzahl der Gene beläuft sich auf etwa 45.500 (Street & Tsai 2010). Bis jetzt stellt das Pappelgenom von Nisqually-1 das am weitesten erforschte Baumgenom dar. Ein Balsampappelklon wurde aufgrund der kommerziellen Bedeutung dieser Sektion in den USA ausgewählt. Da der Klon Nisqually-1 allerdings Schwierigkeiten in Gewebekultur und Transformierbarkeit birgt, sind Espenhybriden weiterhin unverzichtbar für die funktionelle Genomik (Douglas & DiFazio 2010). Mittlerweile wurden für Espen und Espenhybriden weitere Genomsequenzen, teilweise noch unvollständig, veröffentlicht: *P. × canescens* (Klon INRA 717-1B4, Xue *et al.* 2015), *P. tremula*, *P. tremuloides* und *P. tremula × P. tremuloides* (Klon T89, <http://popgenie.org>, Zugriff am 11.01.16). Darüber hinaus wird an der Sequenzierung weiterer Arten gearbeitet, darunter *P. tremula* (Klon W52, Fladung *et al.*, Thünen-Institut für Forstgenetik, unpubliziert) und ein haploider Klon von (*P. deltoides × nigra*) × *nigra* (Fladung *et al.*, Thünen-Institut für Forstgenetik, unpubliziert).

Expressed Sequence Tags

Zahlreiche Studien zu genomischen Elementen erleichtern die Arbeit mit dieser Pflanzengattung. Vor den Genomsequenzierungen stellten *Expressed Sequence Tags* (ESTs) die bedeutendste Quelle für Sequenzinformationen dar, die aber heutzutage bei der Bewertung von Genannotationen weiterhin hilfreich sind (Street & Tsai 2010). Street & Tsai (2010) listen die acht größten EST-Datenbanken auf. Für nicht-sequenzierte Pappelarten sind ESTs immer noch eine wertvolle Ressource. ESTs sind beispielsweise von den (teil-)sequenzierten Arten *P. trichocarpa* und *P. tremula × P. tremuloides* in der NCBI-Datenbank (<https://ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/lbrowse2.cgi>, Zugriff am 16.01.2016) hinterlegt, bestehen aber auch für *P. euphratica*, *P. deltoides* BARTRAM, *P. nigra*, *P. tremula*, *P. tremuloides* sowie für Hybride wie *P. alba × P. tremula*, *P. trichocarpa × P. deltoides*, *P. trichocarpa × P. nigra* oder *Populus × canadensis* MOENCH (<http://mycor.nancy.inra.fr/IMGC/PoplarGenome> und <http://www.plantgdb.org/prj/ESTCluster>, Zugriffe am 16.01.16). Für *P. trichocarpa* ist darüber hinaus eine „BAC Bibliothek“ (**bacterial artificial chromosome**) verfügbar, die 48.000 Sequenzen enthält und auf dem Genotyp Nisqually-1 basiert (Douglas & DiFazio 2010).

SSR und genetische Kartierungen

Genomische Strukturen wie Mikrosatelliten werden vielfach zur Entwicklung genetischer Marker verwendet. Identifizierte Mikrosatelliten liegen vor in Balsampappeln wie *P. trichocarpa* (http://www.web.ornl.gov/sci/ipgc/ssr_resources.htm, Zugriff am 16.01.2016), Schwarzpappeln wie *P. nigra* (Gaudet *et al.* 2007) und Espen wie *P. tremuloides* (Dayanandan *et al.* 1998) oder auch für den Versuchsklon Esch5 der Hybride *P. tremula* × *P. tremuloides* (Bruegmann & Fladung 2013).

Mikrosatelliten wurden auch verwendet um genetische Kartierungen vorzunehmen, sodass mittlerweile Karten vorliegen für *P. deltoides*, *P. trichocarpa* (Cervera *et al.* 2001), *P. nigra* (Cervera *et al.* 2001, Gaudet *et al.* 2007), *P. deltoides* × *P. canadensis* (Yin *et al.* 2002), *P. tremula* und *P. tremuloides* (Pakull *et al.* 2009).

1.4 Gentechnik bei Bäumen

1.4.1 Historische Einordnung

Seit über drei Jahrzehnten werden Pflanzen durch Transformation genetisch verändert (Van Montagu 2011). Der Methodik liegt ein natürlicher Mechanismus zu Grunde, dessen Entdeckung zu Beginn des 20. Jahrhunderts anging: Die Bildung von Wurzelhalsgallen, die als Geschwürganne an Blumen und Obstbäumen beobachtet werden können, wurde bereits 1907 mit Bakterien in Zusammenhang gebracht, die damals noch als „*Bacterium tumefaciens*“ bezeichnet wurden (Smith & Townsend 1907). Ende der 1940er Jahre wurde berichtet, dass die Bakterien der Art *Agrobacterium tumefaciens* einen Tumor-induzierenden Mechanismus auf die Pflanzenzelle übertragen (Braun 1947), und 1967 konnten erstmals DNA-Sequenzen von *A. tumefaciens* in sterilen Pflanzentumoren nachgewiesen werden (Schilperoort 1967). Dass der Tumor-induzierende Mechanismus auf einem großen Plasmid, dem Tumor-induzierenden Plasmid (Ti-Plasmid) basiert, wurde 1974 von Zaenen *et al.* erkannt. Chilton *et al.* (1977) erkannten, dass Plasmid-DNA aus den Agrobakterien in die Pflanzenzelle integriert wurde, wodurch die Wucherungen auch nach Abtötung der Agrobakterien weiter wachsen können. Auf diesem Plasmid wurde ein DNA-Abschnitt charakterisiert, der von zwei 25 bp langen Signalsequenzen begrenzt wird, der *Left Border* und der *Right Border*. Dieser Abschnitt wird als Transfer-DNA (T-DNA) bezeichnet und bei der genetischen Transformation in die Pflanzenzelle übertragen (Thomashow *et al.* 1980, Zambryski *et al.* 1980, Tinland 1996).

Der natürliche Mechanismus der DNA-Übertragung wurde ab den 1980er Jahren derart modifiziert, dass gewünschte Sequenzen in Pflanzenzellen übertragen und dort ins Genom integriert werden können. Die ersten erfolgreichen Transformationen wurden 1983 zeitgleich von mehreren Arbeitsgruppen veröffentlicht (Bevan *et al.* 1983, Fraley *et al.* 1983, Herrera-Estrella *et al.* 1983). Die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation ist seitdem Standardmethode zur genetischen Transformation von Pflanzenzellen, wobei zwischenzeitlich auch weitere Methoden etabliert wurden, z. B. die biolistische Transformation, bei der mit DNA beschichtete Metallpartikel in Pflanzenzellen geschossen werden (Sanford *et al.* 1987).

Durch die beschriebenen Technologien wurden zahlreiche unterschiedliche Pflanzen gentechnisch verändert. Im Jahr 2015 lag die weltweite Anbaufläche von gentechnisch veränderten Pflanzen bei 179,7 Mio. Hektar (James 2015). Derzeit werden Methoden entwickelt, die als „Züchtung 3.0“ zusammengefasst werden und mit denen basengenaue DNA-Veränderungen vorgenommen werden

können, die teilweise nicht mehr von unveränderten Pflanzen unterschieden werden können (Jany & Kellmann 2015).

Pappeln waren die ersten transformierten hölzernen Pflanzen: Die erste *Agrobacterium*-vermittelte Transformation der Hybridpappel *P. trichocarpa* × *P. deltoides* wurde 1986 von Parsons *et al.* publiziert. Die erste zielgerichtete Transformation zur Integration von ausgesuchten Genen wurde ein Jahr später veröffentlicht. Die eingeschleusten Transgene waren hier die Herbizidresistenz *aroA* und das Markergen *NPTII* (Fillatti *et al.* 1987). Mittlerweile wurden Pappeln und Pappelhybride der Sektionen *Populus*, *Aigeiros* und *Tacamahaca* erfolgreich transformiert (Busov *et al.* 2010).

1.4.2 *Agrobacterium*-vermittelte Transformation

Die beiden Agrobakterien *Agrobacterium tumefaciens* und *Agrobacterium rhizogenes* sind α -Proteobakterien der Familie der *Rhizobiaceae* (Wood *et al.* 2001). Sie verfügen über einen natürlichen Mechanismus, bestimmte Teile ihrer Erbinformationen in Pflanzenzellen einzuschleusen. Er beruht darauf, dass Agrobakterien von Acetosyringon angezogen werden, das Pflanzen aus verwundetem Gewebe ausscheiden. Auf molekularer Ebene wird der Sensor *VirA* auf der Zelloberfläche durch den Kontakt zu Acetosyringon autophosphoryliert. Das Phosphat wird auf das DNA-bindende Protein *VirG* übertragen, was daraufhin die Expression der *vir*-Gene auf dem Ti-Plasmid im Zellinnern aktiviert. Zwei der Gene produzieren *VirD1* und *VirD2*, die als Endonukleasen die T-DNA aus dem Plasmid heraustrennen. *VirD2* bindet an das 5'-Ende der einzelsträngigen T-DNA und Helicasen lösen den Strang aus der verwundenen Plasmidstruktur heraus. Die einzelsträngige Lücke auf dem Plasmid wird wieder vervollständigt. Die T-DNA wird vom Protein *VirE2* umhüllt und so aus dem Bakterium in die Pflanzenzelle übertragen. Für die Übertragung bildet die *Agrobacterium*-Zelle einen Pilus, der eine Verbindung zum Cytoplasma der Zielzelle herstellt und durch den die umhüllte T-DNA aktiv transportiert wird. Die beiden Proteine *VirE2* und *VirD2*, die an die T-DNA gebunden bleiben, verfügen über Kernlokalisationssequenzen, die von Proteinen der Pflanzenzelle erkannt werden, woraufhin der Komplex in den Zellkern transportiert wird. Der Einbau der T-DNA in das Pflanzengenom und die Komplementierung des Einzelstrangs erfolgt als Transposon durch pflanzeigene Proteine (DNA-Ligase, DNA-Polymerase und *Chromatin-remodeling*-Proteine). Je nach Promoter wird die eingebaute DNA nun von der Pflanze exprimiert. Natürlicherweise sind im Sequenzabschnitt der T-DNA Opinsynthesen kodiert. Die vom pflanzlichen Stoffwechsel daraufhin produzierten Opine dienen dem Bakterium als Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequelle. Weitere Gene auf der T-DNA kodieren für die Phytohormone Auxin und Cytokinin, die zu Zellvergrößerung und -teilungen anregen, wodurch als typisches Symptom einer Agrobakterien-Infektion Wucherungen, die sogenannten Wurzelhalsgallen, entstehen (Purves *et al.* 2006, Clark & Pazdernik 2009).

1.4.3 Gesellschaftliche Akzeptanz der Gentechnik und Sicherheitsforschung

Über die Akzeptanz grüner Gentechnik im Bereich nachwachsender Rohstoffe bestehen derzeit keine repräsentativen Umfragen. Bezogen auf gentechnisch veränderte Organismen in der Landwirtschaft sprachen sich allerdings in einer repräsentativen Umfrage 76% der Befragten für ein Verbot aus (BMUB 2016). Im Zentrum der Vorbehalte gegen transgene Pflanzen steht das Risiko des Genflusses, also der Ausbreitung des gentechnisch modifizierten Materials (Robledo-Arnuncio *et al.* 2010). Hier wird

befürchtet, dass beispielsweise durch Pollen eine Vermischung mit wilden Artverwandten auftreten könnte. Weiterer Kritikpunkt ist die mutmaßlich beschleunigte Evolution von herbizidresistenten Pflanzen durch den Einsatz von Herbiziden wie Glyphosat auf Flächen mit genetisch modifizierten und dadurch resistenten Kulturpflanzen. In Gilbert (2013) wurde dargestellt, dass sich mindestens 24 herbizidresistente Wildkräuter seit der Markteinführung von Glyphosat entstanden, allerdings wurde dieser Effekt auch bei herkömmlichen Herbiziden wie Atrazin festgestellt, gegen das mittlerweile 64 Wildkräuter resistent sind. Weitere Bedenken sind mit Gesundheitsrisiken für den Menschen und negativen Folgen für die Tierwelt verbunden (Fladung *et al.* 2010, BMUB 2016).

Zur Untersuchung möglicher Auswirkungen auf Mensch, Tier und Umwelt wird seit 1987 im Auftrag der deutschen Bundesregierung Sicherheitsforschung in der Grünen Gentechnik betrieben. Alle Ergebnisse der einzelnen Forschungsprojekte wiesen übereinstimmend darauf hin, dass gentechnisch modifizierte Pflanzen kein höheres Risiko für Umweltbeeinträchtigungen bergen als konventionell gezüchtete Pflanzen (BMBF 2014). Die Sicherheitsforschung an Bäumen ist von drei Punkten bestimmt: Verhinderung der vegetativen Ausbreitung, Verhinderung von vertikalem Genfluss und Verhinderung von horizontalem Genfluss. Bei der Risikobewertung ist zu beachten, dass viele Baumarten durch die Bildung von Wurzelbrut in der Lage sind, vegetativ auszubreiten (Häggman *et al.* 2014). Zur Verhinderung von vertikalem Genfluss wird an der genetisch induzierten Sterilität gearbeitet, sodass transgene Pflanzen ein isolierter Genpool bleiben und es nicht zur unkontrollierten Auskreuzung und Ausbreitung kommt (Fladung & Hoenicka 2012). Die speziellen Anforderungen sind auch darin begründet, dass Bäume ein hohes Lebensalter erreichen und ihre Pollen über weite Entfernungen verbreitet werden können. Eine Ausbreitung transgener Bäume könnte also langfristige Nachwirkungen haben (Fladung & Hoenicka 2006). Horizontaler Genfluss von höheren Pflanzen auf Bodenbakterien oder -pilze konnte bisher nicht beobachtet werden. Obwohl horizontaler Genfluss von Pflanzen zu anderen Eukaryoten grundsätzlich vorkommen kann, ist dies unter natürlichen Bedingungen extrem unwahrscheinlich (BMBF 2014, Häggman *et al.* 2014).

Zur Risikobewertung transgener Pflanzen wurden Freilandversuche durchgeführt, um realitätsnah ihre Auswirkungen auf die Umwelt zu untersuchen. Der erste deutsche Freisetzungversuch mit Bäumen wurde 1996 vom heutigen Thünen-Institut für Forstgenetik initiiert und für fünf Jahre kultiviert (Fladung *et al.* 2004). Ein zweiter Freisetzungversuch wurde zwischen 2000 und 2003 durchgeführt. Anhand transgener Espen wurden unter anderem die Stabilität und Expression von Fremdgenen unter realistischen Freilandbedingungen sowie die Interaktion mit Mykorrhiza-Pilzen untersucht. Horizontaler Gentransfer konnte dabei nicht beobachtet werden (Fladung & Hoenicka 2012). Zwei weitere Freisetzungversuche wurden in Sachsen-Anhalt durchgeführt, bei denen es um Phytoremediation und Biosicherheit von transgenen Bäumen ging (Peuke & Rennenberg 2006). Insgesamt werden in Deutschland seit 2013 keine Freilandversuche mit gentechnisch veränderten Pflanzen durchgeführt (Fladung 2015). In keinem der in den letzten 20 Jahren auf nationaler und internationaler Ebene durchgeführten Freilandversuchen konnte ein Risiko für die Umwelt oder die menschliche Gesundheit festgestellt werden (Häggman *et al.* 2014).

Um die Verbreitung von Antibiotika-Resistenzen zu verhindern, die als Selektionsmarker in transgenen Pflanzen dienen, kommen moderne Biotechnologien, auch als „Züchtung 3.0“ bezeichnet, zunehmend ohne

Resistenzen aus (F. Hartung, Julius-Kühn-Institut, persönliche Mitteilung). Cisgene Pflanzen enthalten ausschließlich genetische Elemente aus nahe verwandten, kreuzbaren Arten. Die produzierten Pflanzen könnten demnach auch auf natürlichem Wege durch Kreuzung entstehen (Jany & Kellmann 2015). Sie enthalten keine Antibiotika-Resistenzen, beispielhaft am Apfel gezeigt (Krens *et al.* 2015). Bei der Intragenese werden regulatorische Elemente den Pflanzen entnommen, modifiziert und wieder in die Spenderpflanze integriert. Obwohl kein artfremdes Material in die Pflanzen eingebracht wird, handelt es sich hierbei um transgene Pflanzen. Weitere Techniken sind die Agro-Infiltration, bei der das Transgen nicht replikationsfähig ist und die transgene Pflanze nicht weiter verbreitet wird, die Nutzung von sequenzspezifischen Nukleasen (CRISPR/Cas, Jinek *et al.* 2012) oder die RNA-abhängige DNA-Methylierung zur epigenetischen Modifikation (Jany & Kellmann 2015, F. Hartung, Julius-Kühn-Institut, persönliche Mitteilung).

1.4.4 Entwicklung von Nutzungsstrategien gentechnisch veränderter Bäume

Bäume unterscheiden sich von krautigen Energiepflanzen grundlegend durch die deutlich längere vegetative Phase, bevor es zur Blütenbildung kommt. Während beispielsweise Raps und Mais im Jahr der Keimung fertil werden, vergehen mindestens vier Jahre, ehe in Pappeln die Blütenbildung einsetzt, in natürlichen Populationen sogar mindestens zehn bis zu 15 Jahre (DiFazio *et al.* 2011, Slavov & Zhelev 2010). In anderen Waldbaumarten dauert dies noch länger (Tab. 1.1). Dadurch ist die Kreuzungszüchtung im forstwirtschaftlichen Kontext zeitlich stark beeinträchtigt. Während Getreidepflanzen seit Jahrtausenden vom Menschen genutzt und durch Züchtung stark domestiziert sind, sind Bäume vergleichsweise unbehandelt und verfügen über eine hohe Biodiversität (Fladung 2011).

Tab. 1.1: Zeiträumen der vegetativen Phase vor Einsetzen der Blütenentwicklung und Samenproduktion bei ausgewählten Forstgehölzen

Die Züchtung von Bäumen für die energetische oder stoffliche Verwertung ist ein äußerst langwieriger Prozess. Die Zeit bis zum Einsetzen der Blütenentwicklung ist deutlich länger als bei krautigen Energiepflanzen. Die Fruktifikation beginnt bei Solitärbäumen meist früher, im geschlossenen Bestand eher später (Schütt *et al.* 2006).

Pflanzenart	Länge der vegetativen Phase	
<i>Populus spec.</i>	Zwischen 4 und 15 Jahren	(DiFazio <i>et al.</i> 2011)
<i>Betula pendula</i> ROTH	Zwischen 10 und 20 Jahren	(Roloff & Pietzarka 2006)
<i>Quercus robur</i> L.	Zwischen 20 und 40 Jahre	(Aas 2006)
<i>Fagus sylvatica</i> L.	Zwischen 40 und 80 Jahre	(Felbermeier & Mosandl 2006)

Bezogen auf Zuwachsraten, Schädlingsresistenz und Anpassungsfähigkeit an Umweltbedingungen konnten durch konventionelle Züchtung bereits große Fortschritte erzielt werden, dennoch ist dies durch die langen Generationszeiten ein langwieriger Prozess. Unabhängig von frühblühenden Ausgangsklonen ist die klassische Forstpflanzenzüchtung zu langsam für die drängenden Anforderungen, die insbesondere aus dem fortschreitenden Klimawandel resultieren. Ein Zeitraum von zehn bis 15 Jahren ist angemessen, um auf Einflüsse zu reagieren und stresstolerante Pflanzen zu erzeugen (Fladung 2011). Gentechnische Methoden können die Nachteile der konventionellen Züchtung überwinden und eine sinnvolle Ergänzung darstellen (Ye *et al.* 2011, Fladung 2011). Die Anwendung gentechnischer Methoden an Bäumen richtet sich primär nach kommerziellen Interessen und ist hauptsächlich auf drei Gebiete fokussiert: a)

Modifikation von Lignin- oder Cellulosebiosynthese, b) Stressresistenz gegen Insekten, Herbizide, Antibiotika und Trockenheit sowie c) Phytoremediation. In allen drei Bereichen dienen Pappeln als Modellorganismen (Ye *et al.* 2011, Fladung 2011).

Ungeachtet des schnellen Wachstums von Pappeln ist die praktische Nutzung als Bioenergiequelle durch die chemische Zusammensetzung der Zellwände limitiert. Für die energetische Nutzung ist es erstrebenswert, den Anteil und die Aufschlussfähigkeit von Kohlenhydraten wie Cellulose zu steigern und den Ligningehalt zu reduzieren oder dessen Zusammensetzung zu verändern (Yuan *et al.* 2008). Durch die Modifikation unterschiedlicher Gene in den Synthesewegen von Lignin und Cellulose konnten beachtliche Erfolge erzielt werden. Beispielsweise konnte der Ligningehalt um 17% reduziert werden durch Herabregulation der Kaffeesäure-*O*-Methyltransferase (englisch *Caffeic acid O-methyltransferase*, kurz COMT, Jouanin *et al.* 2000), um 40% bei der Herabregulation der 4-Coumarat-CoA Ligase (kurz 4CL, Li *et al.* 2003) und sogar um 50% durch herabregulierte Cinnamoyl-CoA Reduktase (kurz CCR, Leplé *et al.* 2007). Eine Steigerung des Cellulosegehalts konnte durch Überexpression von Xyloglucanase oder UDP-Glucose-Pyrophosphorylase erreicht werden (Park *et al.* 2004, Coleman *et al.* 2007). Da die Zusammensetzung der pflanzlichen Zellwände weitere Auswirkungen auf den Wassertransport oder die Abwehr von Pathogenen haben kann, sind bis zur praktischen Nutzbarkeit weitere Tests und Feldstudien nötig (Ye *et al.* 2011).

Insektenfraß ist weltweit der am stärksten limitierende Faktor bei der Produktivität von Pappelanpflanzungen. Weitere Schädlinge wie Pilze oder bakterielle und virale Erreger können ebenfalls die Gesundheit der Pflanzen und ihre Produktivität negativ beeinflussen. Die bekannteste Resistenz gegen Schadinsekten beruht auf einem Toxin aus *Bacillus thuringiensis*, dem Bt-Toxin. Genetisch veränderte, Bt-transgene Pflanzen produzieren dieses Protein, das Insekten beim Fraß zu sich nehmen und im Verdauungstrakt der Insekten tödlich wirkt (Ye *et al.* 2011). Zwei Bt-transgene Pappellinien, „Poplar-12“ und „Poplar-741“, sind die momentan einzigen kommerziell genutzten, transgenen Pappeln weltweit (Hu *et al.* 2001, Tian *et al.* 2000, Tab. 1.2). Sie werden zur Aufforstung im Norden Chinas eingesetzt, um die Verluste durch Schadinsekten zu reduzieren (Fladung 2011).

Tab. 1.2: Genetische Modifikationen der transgenen Pappellinien Poplar-12 und Poplar-741

Die Daten stammen vom „International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications ISAAA“ (<http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/crop/default.asp?CropID=15&Crop=Poplar>, Zugriff am 05.07.15) sowie den angegebenen Veröffentlichungen. Beide Pappeln enthalten neben dem Selektionsmarker *NPTII* Transgene zur Vermittlung von Resistenz gegen Schadinsekten. Der triploide Klon Poplar-741 wurde 1974 in China gezüchtet und soll schnellwachsend sein (G. von Wühlisch, Thünen-Institut für Forstgenetik, persönliche Mitteilung).

Pappelklon	Art	Transgene	Durch das Transgen vermittelte Eigenschaften
Poplar-12 (Hu <i>et al.</i> 2001)	<i>Populus nigra</i>	<i>CRY1AC</i>	Die Pflanze produziert das Delta-Endotoxin aus <i>Bacillus thuringiensis</i> zur Vermittlung der Resistenz gegen Schädlinge der Ordnung <i>Lepidoptera</i> .
		<i>NPTII</i>	Die vermittelte Resistenz gegen Neomycin- und Kanamycin-Antibiotika ist für die Selektion der transgenen Pflanzen erforderlich.
Poplar-741 (Tian <i>et al.</i> 2000)	<i>Populus alba</i> × [<i>P. davidiana</i> × <i>P. simonii</i>] × <i>P. tomentosa</i>	<i>CRY1AC</i>	Die Pflanze produziert das Delta-Endotoxin aus <i>Bacillus thuringiensis</i> zur Vermittlung der Resistenz gegen Schädlinge der Ordnung <i>Lepidoptera</i> .
		<i>API</i>	Das <i>Arrowhead Protease Inhibitor</i> -Protein aus <i>Sagittaria sagittifolia</i> L. vermittelt eine Breitbandresistenz gegen Insektenfraß.
		<i>NPTII</i>	Die vermittelte Resistenz gegen Neomycin- und Kanamycin-Antibiotika ist für die Selektion der transgenen Pflanzen erforderlich.

Mit Schadstoffen verunreinigte Böden und Grundwasser sind weltweit ein bedeutsames Problem. Schwermetalle, andere Metallionen oder organische Verbindungen stellen eine Gefahr für Pflanzen, Tiere und den Menschen dar. Die konventionelle Dekontaminierung durch Bodenabtrag, Bodenwaschung oder Extraktion durch physikalisch-chemische Technologien ist allerdings teuer und teilweise sogar ineffektiv (Cherian & Oliveira 2005, Fladung 2011). Seit den 1990er Jahren werden bestimmte Pflanzen, darunter auch Pappeln, zur Phytoremediation eingesetzt. Dabei nehmen die Pflanzen Schadstoffe aus dem Boden auf und renaturieren ihn dadurch. In den Pflanzen laufen biochemische Prozesse ab, wodurch die Schadstoffe chemisch modifiziert, an andere Moleküle gebunden und entweder in den Zellvakuolen gespeichert oder in die Zellwände eingebunden werden (Cherian & Oliveira 2005, Van Aken 2008). Zur endgültigen Beseitigung können die Pflanzen anschließend abgeerntet und fachgerecht entsorgt werden. Die natürlich vorliegende Toleranz gegenüber Schadstoffen und deren Aufnahmekapazität ist allerdings begrenzt (Shim *et al.* 2013). Nicht nur zur Toleranz höherer Schadstoffkonzentrationen werden gentechnische Entwicklungen durchgeführt, sondern auch dahingehend, dass Gene von sogenannten Hyperakkumulatoren, d. h. Pflanzen mit besonders nützlichen Eigenschaften im Bereich der Phytoremediation, in andere Pflanzen übertragen werden. Durch die Expression dieser Gene lässt sich die Aufnahmekapazität oder die biochemische Verwertung innerhalb der Pflanze steigern (Cherian & Oliveira 2005). Auch mit nicht-pflanzlichen Genen wie dem Cytochrom P450 von Säugetieren wurden Pflanzen zur Remediation transformiert (Doty *et al.* 2007).

Als Empfängerpflanzen sind Pappeln und Weiden besonders geeignet. Sie haben ein ausgeprägtes Wurzelsystem, nehmen viel Wasser auf, wachsen schnell und bauen viel Biomasse auf. Pappeln werden bereits zur Beseitigung des Herbizids Atrazin oder des Lösungsmittels Trichlorethen eingesetzt (Cherian & Oliveira 2005). Neben der Aufnahmesteigerung von (auch teilweise chlorhaltigen) organischen Verbindungen wird zusätzlich an der effektiveren Entsorgung von Schwermetallen wie Cadmium und Blei gearbeitet (Song *et al.* 2003, Cherian & Oliveira 2005).

1.5 Biomassebildung bei Pflanzen

1.5.1 Regulation der pflanzlichen Biomassebildung

Die Bildung hölzerner Biomasse wird von mehreren Faktoren beeinflusst, vor allem der Aktivität des vegetativen Sprossapikalmeristems, der Zellelongation, der Zellwandbiosynthese und der Photosynthese (Demura & Ye 2010). Auf jeder dieser Ebenen wirken genetische und molekulare Regulatoren (Abb. 1.9).

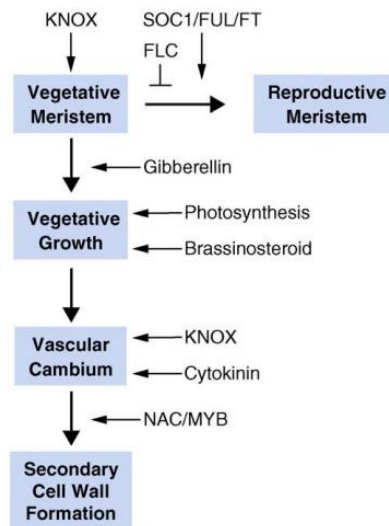


Abb. 1.9: Einflussfaktoren auf verschiedenen Ebenen der Biomassebildung (aus Demura & Ye 2010, modifiziert)

Die Bildung pflanzlicher Biomasse kann auf unterschiedlichen Stufen beeinflusst werden. Eine verzögerte oder verhinderte Transition von vegetativem zu reproductivem Meristem kann durch die Modifikation mehrerer Blütenessene erreicht werden. Die Aktivität des vegetativen Apikalmeristems und des vaskulären Kambiums, ebenfalls ein vegetatives Meristem, kann durch die Überexpression von KNOX Homöobox-Genen gesteigert werden. Zusätzlich haben Cytokinine einen Einfluss auf das Kambium. Während Gibberellineinfluss die Zellelongation steigern kann, können Veränderungen in der Photosynthese oder im Brassinosteroidhaushalt das vegetative Wachstum positiv beeinflussen. NAC/MYB-Transkriptionsfaktoren aktivieren oder steigern Gene, die an der Bildung der sekundären Zellwand beteiligt sind (Demura & Ye 2010).

Vegetatives Gewebe wird von vegetativen Meristemen gebildet, allen voran dem Sprossapikalmeristem für das Längenwachstum und dem vaskulären Kambium für das sekundäre Dickenwachstum. Die verlängerte oder gesteigerte Aktivität der vegetativen Meristeme kann zur gesteigerten Produktion von vegetativen Geweben führen, was sich positiv in der aufgebauten Biomasse niederschlägt. Die verlängerte vegetative Aktivität des Sprossapikalmeristems wird erreicht, wenn die Transition von vegetativem zu reproductivem Meristem verhindert oder herausgezögert wird. Die von Salehi *et al.* (2005) beschriebene Überexpression von *FLC* in *Nicotiana tabacum* L. führte zu verzögerter Blüte und gesteigerter Biomasse. Induziert wird die Transition durch die Transkriptionsfaktoren SOC1, FUL und FT (Demura & Ye 2010, siehe Abschnitt 1.5.2 Einfluss von *SOC1* und *FUL* auf die Biomassebildung). Auf das vaskuläre Kambium wirkt Cytokinin induzierend. Wenn in transgenen Pappeln die Cytokinin-Konzentration durch Überexpression von Cytokinin-abbauenden Genen reduziert wird, wird auch die Holzbildung gedrosselt (Nieminen *et al.* 2008). Beide Meristeme reagieren sensitiv auf KNOX Homöobox-Gene. Ihre Überexpression führte in der Pappel zu gesteigerter Meristemaktivität (Du *et al.* 2009).

Die Zellelongation wird primär hormonell gesteuert und durch Gibberellin gesteigert (Demura & Ye 2010). Eine durch die Überexpression der GA20-Oxidase gesteigerte Gibberellin-Produktion führte in der

Pappel zu stark gesteigerter Pflanzenhöhe. Das Gesamtgewicht der trockenen Biomasse war dadurch erhöht (Eriksson *et al.* 2000).

Die Zellwandbiosynthese mit den inbegriffenen Synthesen von Cellulose, Hemicellulosen und Lignin wird durch NAC- und MYB-Transkriptionsfaktoren gesteuert. Sie sind den direkten Regulatoren der Synthesegene vorgeschaltet und induzieren so die Biomassebildung (Demura & Ye 2010).

Durch die Photosynthese stehen den Pflanzenzellen Kohlenhydrate zur Verfügung. Dieser Prozess hat somit einen direkten Einfluss auf das vegetative Wachstum. Pflanzen mit einer C4-Photosynthese sind im tropischen Raum durch ihre Fähigkeit zur CO₂-Konzentration in den Blättern den C3-Pflanzen in der Biomassebildung überlegen. Nicht zuletzt deswegen dienen die C4-Pflanzen *Zea mays* L. und *Miscanthus spec.* als Energiepflanzen (Demura & Ye 2010). Unabhängig vom Photosynthese-Typ ist allerdings auch bei erhöhter Blattfläche die photosynthetische Aktivität und somit auch die Biomassebildung gesteigert (Dohleman & Long 2009). Durch Brassinosteroide wird der Blattstellwinkel beeinflusst. Bei Aufrichtung der Blätter kann mehr Licht darauf fallen, wodurch ebenfalls die photosynthetische Aktivität erhöht wird (Demura & Ye 2010).

1.5.2 Einfluss von *SOC1* und *FUL* auf die Biomassebildung

In der Ackerschmalwand *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. konnte ein bedeutender Einfluss der beiden Gene *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1* (*SOC1*) und *FRUITFULL* (*FUL*) auf die Biomassebildung nachgewiesen werden. In einer Arbeit von Melzer *et al.* (2008) wurden Doppelmutanten gefunden, in denen sowohl *SOC1* als auch *FUL* herabreguliert waren. Diese Linien zeigten einen perennierenden Phänotyp mit floraler Reversion. Florale Reversion beschreibt, dass reproduktive Meristeme nach der Blühperiode wieder zu vegetativen Meristemen wurden, sodass an Stelle des Blütenstands eine neue Blattrosette entstand (Abb. 1.10 A). Daraus kann ein weit verzweigtes, strauchartiges Geflecht folgen (Abb. 1.10 B).

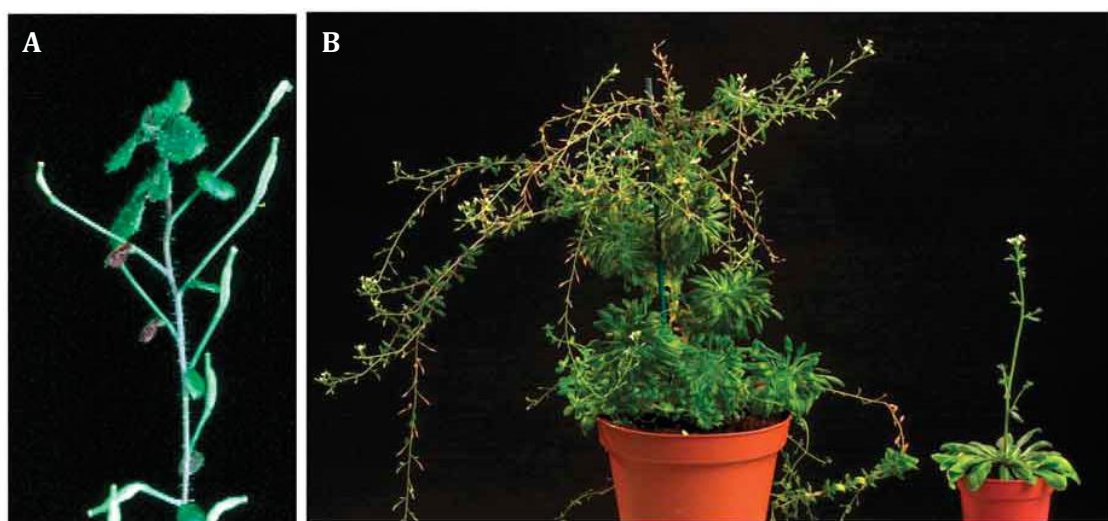


Abb. 1.10: Florale Reversion bei *Arabidopsis thaliana* (aus Melzer *et al.* 2008)

A) Florale Reversion am Blütenstand einer Doppelmutante von *A. thaliana*, in der *SOC1* und *FUL* herabreguliert sind. B) Eine acht Monate alte Doppelmutante von *A. thaliana*, in der *SOC1* und *FUL* herabreguliert sind, zeigt florale Reversion. Zum Vergleich ist rechts daneben eine Wildtyp-Pflanze von *A. thaliana* mit herkömmlichen Phänotyp abgebildet.

Darüber hinaus beobachteten Melzer *et al.* (2008), dass es bei dieser *Arabidopsis*-Doppelmutante zur Holzbildung kam. Während die Wildtypen nur sehr begrenztes sekundäres Wachstum in den Blüten sprossen zeigten, bildete die *soc1-ful*-Mutante verholzende Stämme. Dies führte zur Ausbildung eines Holzzylinders, der in *Arabidopsis* bisher nicht beobachtet wurde (Abb 1.11).



Abb. 1.11: Hölzerne Sprossachse einer vier Monate alten Doppelmutante von *Arabidopsis* (aus Melzer *et al.* 2008)

Durch die Erkenntnisse von Melzer *et al.* (2008) wurde dargelegt, dass *SOC1* und *FUL* auch einen Einfluss auf die Biomassebildung haben, obwohl beide Gene, auch in Anbetracht ihrer Bezeichnung, als Blühzeitpunktgene bekannt sind. Melzer *et al.* (2008) interpretieren daher, der molekulare Unterschied zwischen ausdauernden und einjährigen Pflanzen scheint relativ gering zu sein und ein Wechsel zwischen diesen Lebensstrategien scheint keine größeren genetischen Innovationen zu erfordern. Offensichtlich können Entwicklungsregulatoren, wie diese beiden Blühzeitpunktgene, evolutionäre Variation stark beeinflussen.

1.6 Kandidatengene

1.6.1 *SOC1* und *FUL* sind Schlüsselgene in der Blühzeitpunktregulation

Die Blütenentwicklung in Pflanzen ist zum einen endogen, also durch genetische Determinierung, und zum anderen exogen, durch äußere Einflüsse, gesteuert. In den meisten Pflanzen sind die exogenen Regulationsfaktoren ausschlaggebend (Schopfer & Brennicke 2010). Diverse Umwelteinflüsse wie die Tageslänge, Umgebungstemperatur, spektrale Zusammensetzung des Lichts haben einen Einfluss auf den Blühzeitpunkt der Pflanze. Dessen Regulation ist in *Arabidopsis* gut erforscht. Die genetische Nähe der Gattung *Populus* zu *Arabidopsis* erlaubt es, die mit *Arabidopsis* entwickelten Modelle in Grundzügen auf die Pappeln zu übertragen (Jansson & Douglas 2007). Hierauf basieren die folgenden Beschreibungen:

Ein wichtiges Element in der Blühzeitpunktregulation ist *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. Dieser zentrale Blührepressor, ein MADS Box-Transkriptionsfaktor, hemmt die Expression von *SOC1*, einem bedeutenden Blühpromoter. *FLC* ist Bestandteil des Temperatur-abhängigen Signalwegs und wird durch Vernalisation, also durch kühle Temperaturen, reprimiert. Sobald *FLC* herunterreguliert ist, wird *SOC1* exprimiert, was die Blütenbildung induzieren kann (Srikanth & Schmid 2011, Putterill *et al.* 2004). Außerdem wird die

Expression von *FLC* durch endogene Faktoren, die in den autonomen Signalwegen zusammengefasst sind, beeinflusst.

FLOWERING LOCUS T (FT) wirkt ebenfalls induzierend auf *SOC1*. *FT* ist der letzte Transkriptionsfaktor aus dem photoperiodischen Signalweg. Er gilt als „Florigen“, das zentrale Signal zur Blüteninduktion (Turck *et al.* 2008). Die Expression von *FT* wird durch das Protein *CONSTANS (CO)* gesteuert, das sensitiv für die Tageslänge ist und bei langen Tagen induzierend wirkt (Putterill *et al.* 2004, Srikanth & Schmid 2011).

SOC1 gehört mit *FLOWERING LOCUS T (FT)* und *LEAFY (LFY)* zu den Blütenentwicklungsintegratoren. Als „Integratoren“ werden die Gene bezeichnet, die am Ende der vielschichtigen Signalwege stehen, an denen zahlreiche Gene beteiligt sein können. *FT* aktiviert die Expression von *SOC1* und über den Transkriptionsfaktor *FD* auch die Expression von *AP1* (Srikanth & Schmid 2011). *SOC1* und *AGAMOUS LIKE 24 (AGL24)*, ein weiterer aktivierender Signalintegrator, regulieren sich gegenseitig und aktivieren die Expression des „Blühens“ *LFY*. *LFY* reguliert sich gegenseitig mit *APETALA1 (AP1)* (Putterill *et al.* 2004). Durch die gegenseitige, netzwerkartige Regulation der Integratoren wird der Blühzeitpunkt optimal auf alle Umweltbedingungen abgestimmt.

FUL wird durch *SOC1* und SPL-Proteine, die aus dem altersabhängigen Signalweg stammen, induziert. *AP1*, *APETALA2 (AP2)*, *FUL*, *CAULIFLOWER (CAL)* und *LFY* regulieren die Identität der Blühmeristeme. Sie lösen schlussendlich gemeinsam die Blütenentwicklung der Pflanze aus (Abb. 1.12).

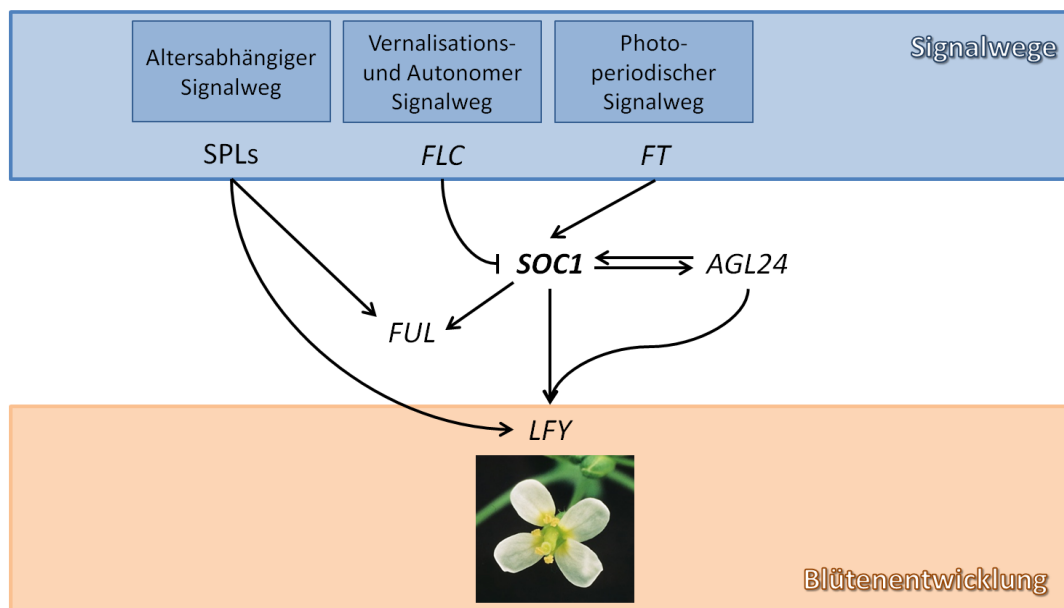


Abb. 1.12: Stellung von *SOC1* und *FUL* in der Blütenentwicklung (nach Srikanth & Schmid 2011)

SOC1 ist ein zentraler Integrator, der die Signale aus den unterschiedlichen Signalwegen empfängt und durch seine Expression *LFY* induziert, wodurch es zur Blütenentwicklung kommt. Außer dem temperaturabhängigen Signalweg mit dem Repressor *FLC* wirken die Signalwege induzierend auf *SOC1*. *SOC1* induziert den Transkriptionsfaktor *FUL*. Die Kenntnisse basieren vornehmlich auf *Arabidopsis*.

1.6.2 SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (*SOC1*)

Das Gen *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1)*, auch als *AGAMOUS-LIKE 20 (AGL20)* bezeichnet, ist ein Schlüsselgen der Blühzeitpunkt-Regulation. Es handelt sich dabei um einen MADS Box-Transkriptionsfaktor (Lee & Lee 2010), wobei als MADS-Box eine DNA-bindende Domäne des Proteins

bezeichnet wird, die die Transkription anderer Gene reguliert. Diese Genfamilie spielt eine bedeutende Rolle in der Pflanzenentwicklung (Leseberg *et al.* 2006). *SOC1* integriert die Signale aus den photoperiodischen, temperaturabhängigen und Gibberellin-Pathways zur Blühinduktion (Borner *et al.* 2000, Putterill *et al.* 2004, Srikanth & Schmid 2011). Der Transkriptionsfaktor wird durch die beiden antagonistischen Blüteregulatoren *CONSTANS* (*CO*) und *FLC* reguliert. Während *FLC* an den Promoter von *SOC1* bindet und so die Expression unterbindet, wirkt *CO* über *FT* aktivierend auf *SOC1* (Lee & Lee 2010). Gibberellin veranlasst die Blüte von *Arabidopsis* durch Hochregulierung der Expression von *SOC1*. *SOC1* bindet nach Aktivierung an den *LEAFY*-Promoter und dient als Aktivator für die nachfolgenden Pathways (Srikanth & Schmid 2011). Die Blüte wird induziert, wenn *SOC1* an der Triebspitze exprimiert wird und zusammen mit *AGAMOUS-LIKE 24* (*AGL24*) das Blühmeristem-Identitätsgen *LFY* aktiviert (Lee & Lee 2010). Transgene *Arabidopsis*-Pflanzen, die unter Induktion des 35S-Promoters *SOC1* konstitutiv exprimieren, zeigen eine „frühe Blüte“, extreme Phänotypen sogar ein Tageslängen-unabhängiges Blühverhalten (Borner *et al.* 2000). *Arabidopsis*-Mutanten mit defizientem *SOC1* haben einen Phänotyp mit verzögerter Blüte, die in Kombination mit ebenfalls defizientem *FUL* sogar noch stärker verzögert auftritt (Melzer *et al.* 2008). Interpretationen wurden dahingehend veröffentlicht, dass MADS Box-Gene wie *SOC1* in der evolutionären Entwicklung von annuellen zu perennierenden Pflanzen beteiligt waren (Lee & Lee 2010). Insgesamt hat die Gruppe der MADS Box-Gene eine Genduplikation erlebt und dadurch auch funktionelle Divergenzen gebildet. Für Orthologe von *SOC1* wurde gezeigt, dass sie auch in vegetativen Geweben regulative Funktionen ausüben (Theissen *et al.* 2000, Lee & Lee 2010).

1.6.3 **FRUITFULL (FUL)**

FRUITFULL (*FUL*), ehemals auch als *AGAMOUS-LIKE 8* (*AGL8*) bezeichnet, ist ein Gen der MADS Box-Genfamilie. Es gehört zu den Typ II MADS Box-Genen und hier in die Gruppe A, der auch *APETALA1* (*AP1*) und *CAULIFLOWER* (*CAL*) zugeschrieben werden (Leseberg *et al.* 2006). Funktionell verhalten sich diese Gene in Hinblick auf die Kontrolle der Blütenarchitektur redundant (Ferrándiz *et al.* 2000). *FUL* ist funktionell weitaus weniger erforscht als das zuvor beschriebene Gen *SOC1*. Bekannt ist, dass *SOC1* die Expression von *FUL* aktiviert (Araki 2001).

FUL ist nach Gu *et al.* (1998) in der Zelldifferenzierung während der Blattbildung und Samenentwicklung von *Arabidopsis* beteiligt. In einer *FUL*-defizienten Mutante von *Arabidopsis* ist die Verlängerung der Samenschote nach der Befruchtung ausgehebelt (Gu *et al.* 1998). Ferrándiz *et al.* (2000) zeigten, dass *Arabidopsis*-Mutanten mit defizientem *FUL* in Kombination mit defizientem *AP1* und *CAL* einen nicht-blühenden Phänotyp zeigen, der statt Blüten vegetative Triebe ausprägt. Die Autoren schlussfolgerten, dass *FUL* die Blütenarchitektur kontrolliert, indem *LFY* beeinflusst wird.

Mit Pappeln ist in Bezug auf *FUL* bislang wenig gearbeitet worden, sodass hier kaum Erkenntnisse vorhanden sind. Die konstitutive Expression von *BpMADS4*, einem *FUL*-Ortholog aus der Hängebirke *Betula pendula*, führte in Birke und Apfel zu früher Blüte (Flachowsky *et al.* 2007). In der Pappel wurde eine verzögerte Seneszens und Dormanz beobachtet, allerdings keine Induktion früher Blüte (Hoenicka *et al.* 2008).

1.6.4 Weitere Kandidatengene

Im Jahr 2011 wurden jeweils eine Transkriptomanalyse von Kambium einer Hybridespe *P. tremula* × *P. tremuloides* (Kersten *et al.*, Thünen-Institut für Forstgenetik, unpubliziert) und von *P. trichocarpa* (Leplé *et al.*, INRA Orléans, unpubliziert) durchgeführt.

Als Materialspender für die Hybridespen-Analyse diente ein fünf Jahre altes Individuum des Klons Esch5. Dabei wurden 19139 Transkripte identifiziert, von denen 707 als Transkriptionsfaktoren oder -regulatoren identifiziert wurden. Diese Gene wurden mit Hilfe des eFP-Browsers (<http://bar.utoronto.ca/efppop/cgi-bin/efpWeb.cgi>) auf ihre Expression in verschiedenen Geweben untersucht. Da eine Auswirkung auf die Biomassebildung gewünscht war, wurden Gene gesucht, die auch nach dieser Datengrundlage im Xylem exprimiert wurden. Mit dem Hintergrund, dass die Blütengene *SOC1* und *FUL* wie beschrieben einen Einfluss auf die Biomassebildung haben können, sollen einige Kandidatengene parallel auch in der Blüte exprimiert werden. Ebenfalls wurden Gene gesucht, die neben dem Xylem auch in den Wurzeln exprimiert werden, um zu ermitteln, ob auch dadurch ein Einfluss auf die Biomassebildung möglich ist.

Nach allen Abwägungen wurden drei Gene mit DNA-bindenden Domänen aus der Esch5-Transkriptomanalyse zu Kandidatengenen ernannt: POPTR_0002s03580, POPTR_0005s12520 und POPTR_0007s14560. Zudem wurde aus den identifizierten Transkripten mit POPTR_0002s22040.1 ein weiteres Gen ausgewählt, das zwar kein Transkriptionsfaktor war, allerdings auffällig stark exprimiert war. Aus der zweiten Transkriptomanalyse von *P. trichocarpa* wurde POPTR_0019s11440 als Kandidatengen ausgewählt, ein Gen mit bislang unbekannter Funktion und Lokalisierung auf dem putativen Geschlechtschromosom 19 (Tab. 1.3). Nach der Analyse im eFP-Browser waren alle ausgewählten Gene sowohl im sich entwickelnden Xylem als auch in der Blüte bzw. sowohl im sich entwickelnden Xylem als auch den Wurzeln exprimiert.

Tab. 1.3: Ausgewählte Kandidatengene der Transkriptomanalysen von *P. tremula* × *P. tremuloides* bzw. *P. trichocarpa*

Die Ergebnisse stammen von Kersten *et al.*, Thünen-Institut for Forstgenetik, unpubliziert, sowie Leplé *et al.*, INRA Orléans, unpubliziert. Die Frequenz bezieht sich auf das angegebene Transkript des jeweiligen Gens, beginnend mit „POPTR_“.

Kandidatengen	Transkriptomanalyse	Funktionelle Beschreibung	Frequenz
POPTR_0007s14560.2 Potri.007G008600	<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i> (Kersten <i>et al.</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Ähnlich einem putativen Transkriptionsfaktor aus <i>Ricinus communis</i> L. 	9036
POPTR_0002s03580.1 Potri.002G034400	<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i> (Kersten <i>et al.</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Zugeordnet dem Sekundärmetabolismus • Annotiert als <i>NmrA-like</i> transkriptionelles Regulatorprotein • Ähnlich dem Gen At1G75280, einer putativen Isoflavonreduktase aus <i>A. thaliana</i> 	516
POPTR_0019s11440.1 Potri.019G084600	<i>P. trichocarpa</i> (Leplé <i>et al.</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Keine funktionelle Beschreibung 	
POPTR_0005s12520.1 Potri.005G123800	<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i> (Kersten <i>et al.</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Annotiert als GRAS-Transkriptionsfaktor • Geringe Ähnlichkeit zu einem DELLA-Protein aus <i>Oryza sativa</i> L. (Reis), welche in der Blühinduktion beteiligt sind (Srikanth & Schmid 2011) 	143
POPTR_0002s22040.1 Potri.002G223100	<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i> (Kersten <i>et al.</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Keine funktionelle Beschreibung 	1586

Abschließend soll darauf hingewiesen werden, dass sich die Nomenklatur der Gene sich im Laufe der Forschungsarbeiten verändert hat. Dies resultiert aus einer neuen, der dritten, Ausgabe der Genomsequenz von Nisqually-1 (Tuskan *et al.* 2006). Bis 2013 waren die Gene mit „POPTR“ (für die Initialen von *Populus trichocarpa*), einer folgenden vierstelligen Nummer für das Scaffold, einem „s“ und einer fünfstelligen Nummer für das putative Gen bezeichnet. Seit der Veröffentlichung der neuen Sequenzversion werden die Gene mit „Potri“ (für die Initialen von *Populus trichocarpa*), einer dreistelligen Nummer für das Scaffold, einem „G“ und einer sechsstelligen Nummer für das Gen bezeichnet. Im Zuge der Aktualisierung wurden einige Gene einem neuen Scaffold zugeordnet. Dies betraf allerdings nicht die genannten ausgewählten Kandidatengene.

1.7 Zielsetzung

Die vorliegenden Erkenntnisse zeigten, dass die beiden MADS Box-Transkriptionsfaktoren *SOC1* und *FUL* nicht nur in der Blütenentwicklung beteiligt sind, sondern auch einen Einfluss auf die Biomassebildung haben. Die Hinweise, die anhand von *Arabidopsis* gewonnen wurden, sollten auf die Pappel übertragen werden. In transgenen Ansätzen zur Herunterregulierung und Überexpression sollte ein Einfluss dieser beiden Gene auf die Biomassebildung überprüft werden.

Die Funktion der fünf weiteren, ausgewählten Kandidatengene ist größtenteils unbekannt. In einer Metaanalyse sollten weitere Informationen über sie und ihren möglichen Einfluss auf die Biomassebildung gewonnen werden. In transgenen *Knockdown*- und Überexpressionsansätzen wurden die Gene in der Pappel modifiziert. Die daraus resultierenden Auswirkungen auf die Phänotypen der Pappeln und ihre Biomassezusammensetzung sollten ermittelt werden.

Für diese Arbeit standen die folgenden drei Hypothesen im Fokus:

1. Die Überexpression von *SOC1* und *FUL* führt zu reduzierter Biomassebildung.
2. Der *Knockdown* von *SOC1* und *FUL* führt zu verstärkter Biomassebildung.
3. Die Überexpression oder der *Knockdown* von Genen, die jeweils in der Blüte und dem sich entwickelndem Xylem oder in den Wurzeln und dem sich entwickelndem Xylem parallel exprimiert werden, führen zu Veränderungen in der Biomasse der Pappel.



2 Material und Methoden

2.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterial

Die verwendeten Laborgeräte sind in Tab. 2.1 aufgelistet.

Tab. 2.1: Verwendete Laborgeräte (alphabetisch sortiert)

Soweit nicht anders angegeben, befindet sich der Firmensitz der Hersteller in Deutschland.

Gerät	Hersteller
Bioanalyser „Agilent 2100“	Agilent Technologies (Waldbronn)
Dampfsterilisator „Laboklav Eco“	SHP Steriltechnik (Detzel Schloss/Satuelle)
Dampfsterilisator „Varioklav“	HP Medizintechnik (Oberschleißheim)
Elektrophoresekammern und Zubehör	Biometra (Göttingen)
Geldokumentationsapparat	Intas (Göttingen)
Glasperlensterilisator „Steri350“	Keller (Burgdorf, Schweiz)
Heizblock	Deelux Labortechnik (Gödenstorf)
Hybridisierungsinkubator „GFL 3032“	GFL (Burgwedel)
Kühlzentrifuge „Biofuge 28 RS“	Heraeus (Hanau)/Thermo Scientific (Waltham, USA)
Kühlzentrifuge „Fresco 21“	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Kühlzentrifuge „Mikro 200R“	Hettich (Tuttlingen)
Lichtmessgerät „LI-185B“	LI-COR (Lincoln, USA)
Magnetrührer „Cimarec i Poly“ und „Variomag Mono“	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Magnetrührer „Ikamag Reo“ und „Ikamag Ret“	IKA Labortechnik (Staufen)
Mehrkanalpipetten	Biohit (Helsinki, Finnland)
Mikropipetten	Eppendorf (Hamburg)
Mikrowellenofen	Panasonic (Kadoma, Japan) und Bosch (Stuttgart)
Minizentrifuge „Sprout“	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Netzteile „PHERO-stab. 500“	Biotec-Fischer (Reiskirchen)
pH-Meter	WTW (Weilheim)
Präzisionswaage	Sartorius (Göttingen)
Präzisionswaage „Mettler P2000N“	Mettler-Toledo (Gießen)
Präzisionswaage „PCB“	Kern (Balingen)
qRT-PCR „Stratagene Mx3000P“	Stratagene (Santa Clara, USA)
Schwingmühle „MM300“	Retsch (Haan)
Spektralphotometer „NanoDrop 1000 3.7.1“	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Sterilwerkbank	BDK/Weiss Technik (Sonnenbühl-Genkingen)

Tab. 2.1 (Fortsetzung): Verwendete Laborgeräte (alphabetisch sortiert)

Gerät	Hersteller
Sterilwerkbank „Herasafe“	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Sterilwerkbank „Mars Safety Class 2“	Scanlaf/Labogene (Lyngø, Dänemark)
Taumelschüttler „WT 17“	Biometra (Göttingen)
Thermocycler „LabCycler“	SensoQuest (Göttingen)
Thermoschüttler „HLC“	Ditabis (Pforzheim)
Thermoschüttler „PocketBloc“	Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf)
Tischzentrifuge „Biofuge 13“	Heraeus (Hanau)/Thermo Scientific (Waltham, USA)
UV-Crosslinker „UV Stratalinker 2400“	Stratagene (Santa Clara, USA)
Vakuumkonzentrator „Speed Vac Plus SC110A“	Savant/Thermo Scientific (Waltham, USA)
Vortex-Mischer „VF2“	IKA Labortechnik (Staufen)
Wasserbad	GFL (Burgwedel)
Zentrifugen „Biofuge pico“ und „Megafuge 1.0R“	Heraeus (Hanau)/Thermo Scientific (Waltham, USA)

Das Verbrauchsmaterial wie Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, Petrischalen, serologische Pipetten, Präzisionswischtücher, Klebeetiketten, Aluminiumfolie, Klebefolien und Parafilm wurde von den Firmen Sarstedt (Nümbrecht), biolab products (Hamburg), Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf) und Starlab (Hamburg) geliefert.

2.2 Chemikalien

Für die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Experimente und Untersuchungen wurden Chemikalien und Substanzen von namhaften Herstellern wie den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), AppliChem (Darmstadt), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) und Merck (Darmstadt) verwendet. Antibiotika und Medienbestandteile wurden von Duchefa Biochemie (Haarlem, NL) bezogen. Die Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs (Frankfurt am Main) geliefert. Soweit nicht anders angegeben, befindet sich der Firmensitz der Hersteller in Deutschland.

2.3 Pflanzenmaterial

2.3.1 Esch5

Beim Klon „Esch5“ handelte es sich um einen Hybrid der Kreuzung *P. tremula* × *P. tremuloides*. Kreuzungseltern waren die europäische Espe „Brauna11“ und die amerikanische Espe „Turesson141“ (kurz „Tur141“). Esch5 ist diploid (2n) und weiblich (♀). Dieser Klon kann vergleichsweise einfach *in vitro* kultiviert, regeneriert und transformiert werden (Abb. 2.1), sodass er bereits für zahlreiche gentechnische Versuche verwendet wurde (u. a. in Fladung & Ahuja 1996, Fladung *et al.* 1999, Kumar & Fladung 2000, Grünwald *et al.* 2001, Fladung & Becker 2010, Hoenicka *et al.* 2012).

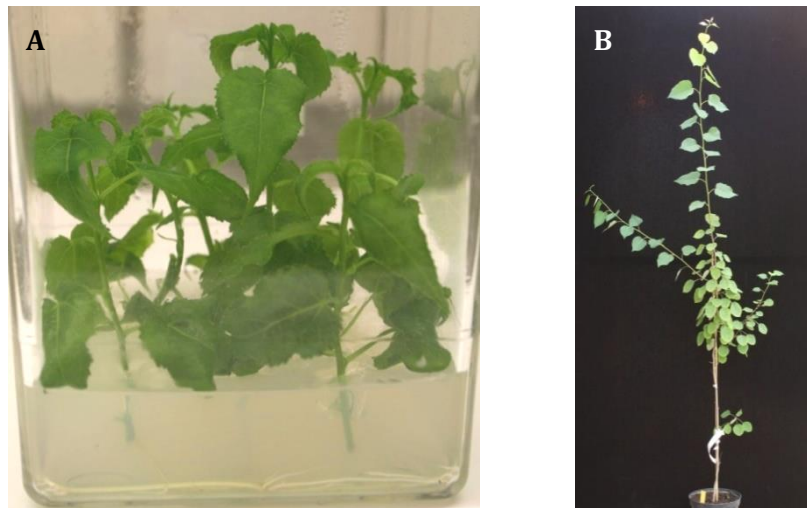


Abb. 2.1: Versuchsklon Esch5 nach dreiwöchigem Wachstum in einem *in vitro*-Kulturgefäß (A) und als zweijährige Pflanze im Gewächshaus (B)

2.3.2 P1

Als Klon „P1“ wird in dieser Dissertation der in der Literatur „INRA 717-1B4“ genannte Klon bezeichnet. Es handelte sich um einen Hybridklon aus *P. tremula* × *P. alba*, der kurz als *P. × canescens* bezeichnet wird (Leple *et al.* 1992). Der verwendete Klon P1 ist diploid (2n) und weiblich (♀). Er zeigt *in vitro* ein schnelles Wachstum, gute Regenerierbarkeit und Transformierbarkeit (Abb. 2.2). Aufgrund dieser positiven Eigenschaften wurde der Klon zu einem Modellklon für transgene Ansätze (Busov *et al.* 2010). Während dieser Studie wurde die Genomsequenz von P1 veröffentlicht (Xue *et al.* 2015).

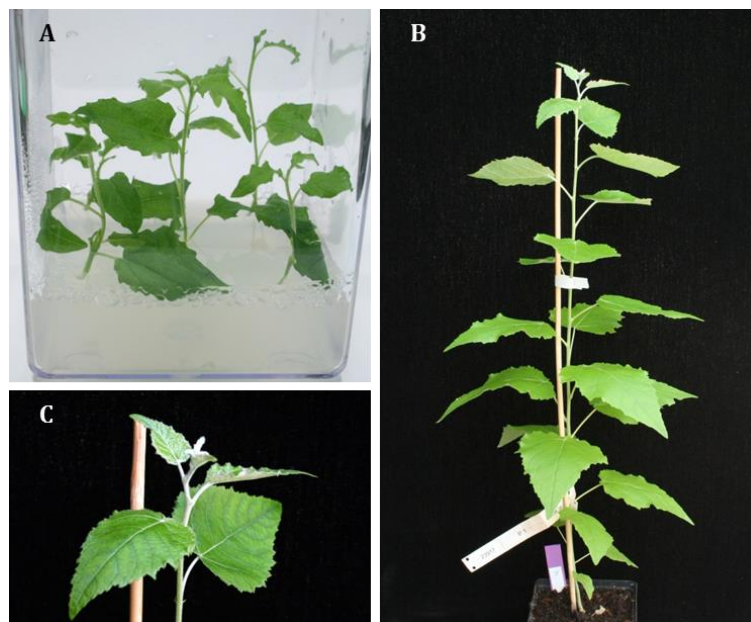


Abb. 2.2: Versuchsklon P1 in der Gewebekultur (A) und als junge Pflanze nach elf Wochen im Gewächshaus (B, C)

In C deutlich zu erkennen sind die für *P. × canescens* charakteristischen weißen Blattunterseiten und Triebspitzen.

2.4 Sterilisation von Gefäßen und Handwerkszeug

Glasgefäße, Kulturgefäße für die Gewebekultur und ähnliches wurden durch Autoklavieren bei 121 °C oder bei 180 °C für 6 h thermisch sterilisiert. Scheren, Pinzetten, Skalpelle und ähnliche Handwerkszeuge wurden im Gasperlensterilisator für min. 10 s auf 260 °C erhitzt.

2.5 Gewebekultur

Die Gewebekultur der Pappeln unterlag konstant geregelten Bedingungen. Die Raumtemperatur betrug 23 °C, die Luftfeuchtigkeit 50% ($\pm 5\%$). Die Beleuchtung wurde 24 Stunden pro Tag aufrechterhalten. Dabei lag die minimale Beleuchtungsstärke für die normale Pappelkultur bei $8 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, die maximale Beleuchtungsstärke bei $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Im optimalen Bereich betrug die Beleuchtungsstärke $18 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Für die Transformationskulturen wurde ein dunklerer Bereich gewählt, bei dem die Beleuchtungsstärke bei $2,5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ lag.

Die Pflanzen wurden in lichtdurchlässigen Kulturgefäßen („Magenta vessels“, Typ GA-7, Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) kultiviert. Diese Behälter hatten eine Grundfläche von $7,7 \times 7,7$ cm und waren 9,7 cm hoch. Der ebenfalls lichtdurchlässige Deckel war im verschlossenen Zustand luftdurchlässig, sodass ein Gasaustausch möglich war. Um Eindringen von Schadorganismen (Bakterien, Pilzsporen, Insekten) zu vermeiden, wurde der Kontaktbereich zwischen Kulturgefäß und Deckel mit zwei Lagen Verschlussfolie („Parafilm“, Fa. Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA) verschlossen. Pro Gefäß wurde je nach Verwendungszweck zwischen 50 mL (kurzzeitige Anzucht, beispielsweise für die Überführung in Erde) und 76 mL (langfristige Kultur zum Erhalt der Linie) Medium verwendet.

2.5.1 460-Medium

Beim Medium „460“ handelte es sich um das Standard-Medium zur *in vitro*-Kultivierung von Pappeln. Ein Liter bestand aus 2,46 g Grundmedium „McCown Woody Plant Medium“ (kurz „WPM“, Fa. Duchefa Biochemie), 20,0 g Saccharose und 6,0-7,5 g Agar. Die eingesetzte Menge an Agar variierte je nach Verwendungszweck, um unterschiedlich festes Medium zu erhalten. Mit deionisiertem Wasser wurde das Volumen auf 1 L aufgefüllt. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 5,8 eingestellt. Das WPM-Grundmedium wurde als verwendungsbereite Mischung bezogen und enthielt alle erforderlichen Makro- und Mikronährstoffe sowie Vitamine (Tab. 2.2).

Tab. 2.2: Nährstoffe im WPM-Grundmedium (übernommen aus Lloyd & McCown 1980)

Die Gesamtkonzentration von Mikro- und Makroelementen inklusive Vitaminen liegt bei 2462,60 mg/L.

Makroelemente	mg/L	mM	Mikroelemente	mg/L	μM	Vitamine	mg/L	μM
CaCl ₂	72,50	0,65	CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0,25	1,00	Glycin	2,00	26,64
Ca(NO ₃) ₂ × 4 H ₂ O	471,26	2,35	FeNaEDTA	36,70	100,00	Myo-Inositol	100,00	554,94
KH ₂ PO ₄	170,00	1,25	H ₃ BO ₃	6,20	100,27	Nicotinsäure	0,50	4,06
K ₂ SO ₄	990,00	5,68	MnSO ₄ × H ₂ O	22,30	131,94	Pyridoxin HCl	0,50	2,43
MgSO ₄	180,54	1,50	Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	0,25	1,03	Thiamin HCl	1,00	2,96
NH ₄ NO ₃	400,00	5,00	ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	8,60	29,91			

2.5.2 Medien 601, 601_{1/2} und 601_{1/4}

Das Medium „601“ war mit dem Phenylharnstoff Thidiazuron (*N*-Phenyl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-ylharnstoff, Abb. 2.3) versetzt. Dieses Phytohormon hat eine Cytokinin-ähnliche Wirkung (Lu 1993) und führt bei Pappeln zu multipler Sprossung (Bonga & von Aderkas 1992, Huetteman & Preece 1993). Das Medium 601 wurde daher zur Regeneration von Pappeln aus zerkleinertem Gewebe genutzt.

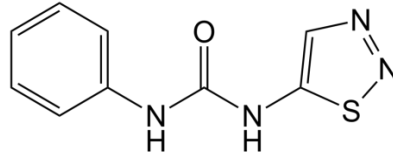


Abb. 2.3: Chemische Struktur von Thidiazuron (Lu 1993)

Thidiazuron ist ein synthetisches Cytokinin, das die Bildung von Adventivsprossen induziert. Es wurde im Rahmen der *Agrobacterium*-vermittelten Transformation zur Regeneration der Explantate eingesetzt.

Medium 601 setzte sich aus 1 L Medium 460 zusammen, das mit 1 mL Pluronic F-68 (Endkonzentration 100 mg/L) und 10 µL Thidiazuron (Endkonzentration 0,0022 mg/L) versetzt wurde. Bei den Medien 601_{1/2} und 601_{1/4} war die Konzentration von Pluronic F-68 und Thidiazuron auf die Hälfte bzw. ein Viertel der Ausgangskonzentration reduziert. Diese Medien wurden für die Dauerkultur von Pflanzen genutzt, die auf Standardmedium abgestorben wären, und für die Entwöhnung der Pflanzen, wenn diese von Thidiazuron-haltigem Medium auf Thidiazuron-freies Standardmedium überführt wurden.

Zur Selektion nach der Transformation wurde 1 L Medium 601 mit 4 mL Cefotaxim (125 mg/mL, Cefotaxim-Natriumsalz, Endkonzentration 500 mg/L) und je nach Selektionsmarker 1 mL Kanamycin (50 mg/mL, Kanamycin-Monosulfat, Endkonzentration 50 mg/L) oder 2 mL Hygromycin (10 mg/mL, Hygromycin B, Endkonzentration 20 mg/L) versetzt. Diese Medien wurden dann mit „C“ für Cefotaxim-, „K“ für Kanamycin- und „H“ für Hygromycin-Zusatz gekennzeichnet.

2.6 Transformationsvektoren

2.6.1 Agrobakterien

Der zur Transformation verwendete *Agrobacterium*-Stamm trug die Bezeichnung GV3101::pMP90RK und basierte genetisch auf dem Stamm *Agrobacterium tumefaciens* C58. Dieser Stamm war „entwaffnet“, also von Genen zur Hormon- und Opinsynthese befreit (Clark & Pazdernik 2009), und trug als Markergen auf dem bakteriellen Chromosom eine Resistenz gegen das Antibiotikum Rifampicin (Goodner *et al.* 2001, Wood *et al.* 2001, Hellens *et al.* 2000). Die Bakterien waren mit dem Tumor-induzierenden Plasmid pMP90RK bestückt, das auf dem Plasmid pTiC58ΔT-DNA basierte und als Markergene die Resistenzen gegen Gentamicin und Kanamycin trug (Hellens *et al.* 2000).

Ein weiterer genutzter *Agrobacterium*-Stamm war EHA105. Dieser wurde auf Grundlage des Stamms EHA101 entwickelt, in dem die Kanamycinresistenz vom Ti-Plasmid entfernt wurde. Durch diese Deletion war es möglich, ein Kanamycin-Resistenzgen in der T-DNA zu platzieren und als Selektionsmarker bei der genetischen Transformation von Pflanzen einzusetzen (Hood *et al.* 1993). Der chromosomale Hintergrund war der bereits zuvor beschriebene Stamm *Agrobacterium tumefaciens* C58 (Hellens *et al.* 2000).

2.6.2 Transformationsplasmide

Während der Transformation wird die T-DNA, die auf dem Ti-Plasmid kodiert ist, in die Pflanzenzelle übertragen und hier ins Pflanzengenom integriert. Die T-DNA beinhaltet daher die für den Transformationserfolg erforderlichen funktionellen Sequenzabschnitte.

Als Promoter wurden der Ubiquitin-Promoter (pUBQ10), der 35S-Promoter sowie der NOS-Promoter verwendet. pUBQ10 war ein konstitutiv exprimierter Promoter aus *Arabidopsis spec.* (Sun & Callis 1997). Der 35S-Promotor ist ein konstitutiv exprimierter Promoter, der ursprünglich aus dem Blumenkohlmosaikvirus (englisch „Cauliflower Mosaic Virus“, kurz „CaMV“) stammte (Benfey & Chua 1990). Der NOS-Promoter stammte aus *Agrobacterium tumefaciens* und reguliert hier die Expression der Nopalinsynthase *NOS* (An 1986).

Als transkriptionelle Terminatoren wurden der 35S-Terminator aus CaMV sowie die NOS- und OCS-Terminatoren eingesetzt. Die beiden letzteren stammten auch ursprünglich aus *A. tumefaciens* und sind dort die transkriptionellen Terminatoren der Nopalinsynthase *nos* bzw. des Octopinsynthase-Gens *ocs*.

Zur Selektion von transgenen Sublinien wurden Antibiotika verwendet. Bewährte Selektionsmarker für die Pappeltransformation waren die Resistenzen gegen Kanamycin, vermittelt durch die Neomycinphosphotransferase *NPTII*, und Hygromycin, vermittelt durch die Hygromycinphosphotransferase *HPT* (Howe *et al.* 1991, Fladung *et al.* 1997). Beide Phosphotransferasegene stammten ursprünglich aus *Escherichia coli* (Beck *et al.* 1982, Gritz & Davies 1983).

2.6.3 Eingesetzte Transformationsvektoren

Zur genetischen Transformation der Pappeln wurden insgesamt 24 Transformationsvektoren verwendet, die in Tab. 2.3 aufgelistet sind. Alle Transformationsvektoren wurden mit dem Buchstaben A und einer fortlaufenden Zahl bezeichnet, z. B. A122. Ebenfalls in Tab. 2.3 aufgeführt sind der Bakterienstamm, die zugehörigen bakteriellen Selektionsantibiotika, die pflanzlichen Selektionsmarker, der Verwendungszweck mit dem „Zielgen“ sowie die durchgeführten Transformationen. Als Zielgen wird in dieser Arbeit das neben dem Selektionsmarker in den Empfängerorganismus übertragene Gen bezeichnet. Die Genkarten der Transformationsvektoren sind im Anhang zusammengestellt.

Tab. 2.3: Verwendete Transformationsvektoren

Für die Transformationen wurden insgesamt 24 verschiedene Vektoren, zur Überexpression oder *Knockdown*, verwendet. Zwei unterschiedliche *Agrobacterium*-Stämme wurden eingesetzt: GV3101-pMP90RK und EHA105. Für die mit * markierten Doppeltransformationen wurde ein mit dem angegebenen Vektor transformierter Pappelklon als Empfängerorganismus verwendet. Abkürzungen: Carb - Carbenicillin, Gent - Gentamicin, Kan - Kanamycin, Rif - Rifampicin, Spec - Spectinomycin, Str - Streptomycin.

Vektor	Agro-bakterienstamm	Antibiotika zur bakteriellen Selektion	Antibiotikum zur pflanzlichen Selektion	Anwendung	Transformationen
A122	C58	Rif, Kan, Carb	Kanamycin	Überexpression <i>SOC1</i>	N 94 (Doppeltransformation mit A137)
A137	C58	Rif, Kan, Gent	Kanamycin	Überexpression <i>FUL</i>	N 94 (Doppeltransformation mit A122), N 407 (Doppeltransformation mit A141)
A141	GV3101-pMP90RK	Rif, Kan, Gent, Str, Spec	Hygromycin	Überexpression <i>SOC1</i>	N 407 (Doppeltransformation mit A137)
A156	GV3101-pMP90RK	Rif, Kan, Gent, Str, Spec	Kanamycin	RNA-Interferenz <i>SOC1 / FUL</i>	N 141, N 145

Tab. 2.3: Verwendete Transformationsvektoren (Fortsetzung)

Vektor	Agro-bakterien-stamm	Antibiotika zur bakteriellen Selektion	Antibiotikum zur pflanzlichen Selektion	Anwendung	Transformationen
A179	GV3101-pMP90RK	Rif, Kan, Gent, Str, Spec	Kanamycin	RNA-Interferenz <i>SOC1</i>	N 266, N 271
A180	GV3101-pMP90RK	Rif, Kan, Gent, Str, Spec	Kanamycin	RNA-Interferenz <i>FUL</i>	N 267, N 272, N 316
A185	GV3101-pMP90RK	Rif, Kan, Gent, Str, Spec	Hygromycin	Überexpression Potri.002G034400	N 282, N 405 (Doppeltransformation mit A194), N 406 (Doppeltransformation mit A200), N 411* (Doppeltransformation mit A200), N 412 (Doppeltransformation mit A194*)
A194	GV3101-pMP90RK	Rif, Kan, Gent, Str, Spec	Kanamycin	Überexpression Potri.007G008600, codonoptimiert	N 311, N 405 (Doppeltransformation mit A185), N 410 (Doppeltransformation mit A201*), N 412* (Doppeltransformation mit A185)
A198	EHA105	Rif, Spec	Kanamycin	amiRNA Potri.007G008600	N 314, N 339
A199	EHA105	Rif, Spec	Kanamycin	amiRNA Potri.002G034400	N 315
A200	GV3101-pMP90RK	Rif, Kan, Gent, Str, Spec	Kanamycin	Überexpression Potri.002G223100	N 321, N 391, N 406 (Doppeltransformation mit A185) und N 411 (Doppeltransformation mit A185*)
A201	GV3101-pMP90RK	Rif, Kan, Gent, Str, Spec	Hygromycin	Überexpression Potri.019G084600	N 322, N 327, N 410* (Doppeltransformation mit A194)
A204	GV3101-pMP90RK	Rif, Kan, Gent, Str, Spec	Hygromycin	Überexpression Potri.005G123800	N 329, N 340
A210	EHA105	Rif, Spec	Kanamycin	amiRNA Potri.002G034400	N 357
A211	EHA105	Rif, Spec	Kanamycin	amiRNA Potri.007G008600	N 356
A220	EHA105	Rif, Spec	Kanamycin	amiRNA Potri.019G084600	N 359
A221	EHA105	Rif, Spec	Kanamycin	amiRNA Potri.002G223100	N 361
A225	GV3101-pMP90RK	Rif, Kan, Gent, Str, Spec	Kanamycin	amiRNA Potri.007G008600	N 368
A226	GV3101-pMP90RK	Rif, Kan, Gent, Str, Spec	Kanamycin	amiRNA Potri.002G034400	N 369
A227	GV3101-pMP90RK	Rif, Kan, Gent, Str, Spec	Kanamycin	amiRNA Potri.002G034400	N 393, N 399
A228	GV3101-pMP90RK	Rif, Kan, Gent, Str, Spec	Kanamycin	amiRNA Potri.007G008600	N 371
A229	GV3101-pMP90RK	Rif, Kan, Gent, Str, Spec	Kanamycin	amiRNA Potri.002G034400	N 372
A230	GV3101-pMP90RK	Rif, Kan, Gent, Str, Spec	Kanamycin	amiRNA Potri.007G008600	N 373
A231	GV3101-pMP90RK	Rif, Kan, Gent, Str, Spec	Kanamycin	amiRNA Potri.019G084600	N 374
A232	GV3101-pMP90RK	Rif, Kan, Gent, Str, Spec	Kanamycin	amiRNA Potri.002G223100	N 375

2.6.4 Plasmid-Sequenzierungen

Für die Transformationsvektoren A137 und A122 lagen keine Sequenzdaten oder Vektorkarten vor, deswegen musste das Plasmid zur Entwicklung von Strategien für molekulare Analysen zunächst sequenziert werden. Ein Vergleich unterschiedlicher Transformationsvektoren ergab, dass die Sequenzen sowohl von *Left Border* als auch *Right Border* hoch konserviert vorliegen (O. Polak, Thünen-Institut für Forstgenetik, unpubliziert). Für die Bereiche der *Right Border* wurden die Primer #1572 (*forward*) und

#608 (*reverse*) synthetisiert. Für die *Left Border* bestand nur der Primer #847 (*forward*). Ein Reverse-Primer für die *Left Border* wurde nicht synthetisiert, da der Primer dreifach selbst-komplementär und somit ineffektiv wäre. Die genannten Primer dienten als Ansatzstellen für die ersten Sequenzierungen. Alle Sequenzierungen wurden von der Firma StarSeq (Mainz) durchgeführt. Dazu wurden 600 ng Plasmid-DNA, die mit Hilfe der Mini-Präparation isoliert wurde, mit 1 µL Primer (10 mM) vermischt und eingeschickt. Soweit geeignete Sequenzabschnitte vorlagen, konnten auch PCRs nach dem in Abschnitt 2.10.2 beschriebenen Schema durchgeführt werden, von deren Produkt 1-2 µL mit 1 µL Primer zur Sequenzierung gegeben wurden. Von der Sequenzierung wurden ab1-Dateien erhalten, die für das Alignment verwendet wurden. Anhand von Referenzen wurden die Sequenzen funktionell annotiert. Ausgehend von bekannten Sequenzen der Transgene und ihrer Selektionsmarker wurden Primer entwickelt, die für abschnittsweise Sequenzierungen verwendet wurden. Die daraus erhaltenen Sequenzen wurden wiederum als Ansatzstellen für neue Sequenzierungen genutzt („Primer Walking“). Das Sequenzalignment wurde mit dem Computerprogramm „SeqMan“ (Fa. DNASTAR, Madison, USA) durchgeführt. Die Sequenzen und das automatische Alignment wurden, wo erforderlich, manuell modifiziert. Die erhaltene Consensus-Sequenz wurde in das Computerprogramm „SeqBuilder“ (Fa. DNASTAR, Madison, USA) überführt, mit Annotationen versehen und in eine Vektorkarte umgewandelt.

2.6.4.1 Transformationsvektor A122: pRT104-35S-SOC1

Das Transformationsplasmid A122 wurde im Jahr 2006 unter der Bezeichnung pRT104-35S-SOC1 von S. Melzer empfangen, um die in Melzer *et al.* (2008) anhand von *Arabidopsis thaliana* beschriebenen Ergebnisse im Modellsystem Pappel nachvollziehen zu können. Über den Vektor war bekannt, dass es sich um einen Agrobakterienstamm der Gruppe C58 handelte und er Resistenzen gegen Rifampicin (auf dem bakteriellen Chromosom des Stamms C58), Kanamycin und Carbenicillin beinhaltet. Die genannte Publikation enthielt allerdings keine Vektorkarte oder Sequenzdaten, sodass das Plasmid sequenziert werden musste. Die für die Sequenzierung des Überexpressionsvektors A122 verwendeten Primer sind im Anhang aufgeführt. Aus den Sequenzierungen des Plasmids A122 wurden 91 Einzelsequenzen erhalten. Diese wurden in einem Alignment zu einer 13.464 bp langen Consensus-Sequenz zusammengeführt, die im Anhang dokumentiert ist. Unter Zuhilfenahme von bekannten Sequenzen und funktionellen Annotationen wurden funktionelle Sequenzbereiche identifiziert (Tab. 2.4) und eine Vektorkarte erstellt (Abb. 2.4).

Tab. 2.4: Funktionelle Annotationen im Transformationsplasmid A122

Die T-DNA umfasste den Bereich von 12651-4086 (farblich hinterlegt, überspannt die Zählgrenze). Mit * markiert sind die Gene, die auf dem komplementären Strang kodiert waren. Das Plasmid pGH00.0131 wurde zur Annotierung der Sequenzierungen herangezogen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KF148031>, Zugriff am 18.08.2015), ebenso das Plasmid pLMB51 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JQ895026>, Zugriff am 18.08.2015)

Sequenzbereich	Annotation	Typ	Funktionsbeschreibung
252..453 *	35S-Terminator	Terminator	Terminator des Blumenkohlmosaikvirus (CaMV)
473..1116 *	<i>soc1</i>	Gen/offener Leserahmen	Zielgen <i>SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1</i>
1198..1562 *	35S-Promoter	Promoter	Promoter des Blumenkohlmosaikvirus (CaMV)
2263..2518 *	<i>NOS</i> -Terminator	Terminator	Terminator der Nopalinsynthese aus <i>A. tumefaciens</i>

Tab. 2.4: Funktionelle Annotationen im Transformationsplasmid A122 (Fortsetzung)

Sequenzbereich	Annotation	Typ	Funktionsbeschreibung
2908..3702 *	<i>nptII</i>	Gen/offener Leserahmen	Neomycinphosphotransferase als Resistenzmarker gegen Kanamycin
3715..4022 *	NOS-Promoter	Promoter	Promoter der Nopalinsynthese aus <i>A. tumefaciens</i>
4063..4086	T-DNA <i>Right Border</i>	Strukturelement	
4196..4520 *	<i>tetA</i>	Gen/offener Leserahmen	Tetracyclin-Resistenzgen (am Ende unvollständig, aus pLMB51)
4524..5201	<i>tetR</i>	Gen/offener Leserahmen	Tetracyclin-Resistenzgen (aus pLMB51)
5372..5750 *	<i>ColE1 ori</i>	Replikationsursprung	Replikationsursprung (aus pGH00.0131)
5744..6527 *	<i>traF</i>	Gen/offener Leserahmen	Konjugationsprotein <i>TraF</i> (Fullner <i>et al.</i> 1996, aus pGH00.0131)
6540..7157 *	<i>oriV</i>	Replikationsursprung	Vegetativer Replikationsursprung (Young <i>et al.</i> 1985, aus pGH00.0131)
7231..7502 *	<i>kilA</i>	Gen/offener Leserahmen	Lethaler Locus (Frisch <i>et al.</i> 1995, aus pGH00.0131)
8814..9608	<i>nptIII</i>	Gen/offener Leserahmen	Aminoglycosid-Phosphotransferase (aus pGH00.0131)
9617..11098 *	<i>trfA</i>	Gen/offener Leserahmen	Plasmid-Replicase (Hellens <i>et al.</i> 2000, aus pGH00.0131)
12651..12674	T-DNA <i>Left Border</i>	Strukturelement	
12728..12858 *	<i>lacI</i>	Gen/offener Leserahmen	Bestandteil des Lactose-Operons (lac-Operon, aus pGH00.0131)
12859...13159 *	<i>M13 ori</i>	Replikationsursprung	Replikationsursprung (aus pGH00.0131)

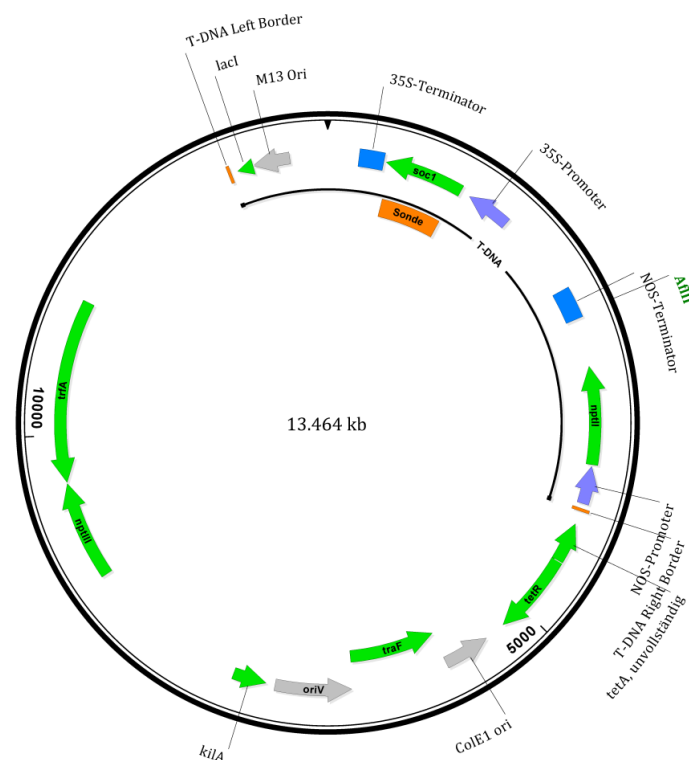


Abb. 2.4: Vektorkarte von Transformationsvektor A122

Das Ti-Plasmid von A122 umfasste insgesamt 13.464 bp. Im Bereich der T-DNA zwischen *Left Border* und *Right Border* waren der Selektionsmarker *NPTII*, flankiert vom NOS-Promoter und -Terminator, und das Zielgen *SOC1*, reguliert durch den 35S-Promoter und -Terminator, kodiert. Verzeichnet sind die Hybridisierungssonde und das Restriktionsenzym *AflIII*, die für das Southern Blot verwendet wurden. Außerhalb der T-DNA waren u. a. weitere Antibiotikumresistenzen und Gene zur Übertragung der T-DNA kodiert.

2.6.4.2 Transformationsvektor A137: pSH9-35S-Ful

Das Transformationsplasmid A137 wurde im Jahr 2006 unter der Bezeichnung pSH9-35S-Ful von S. Melzer empfangen, um die in Melzer *et al.* (2008) anhand von *Arabidopsis thaliana* beschriebenen Ergebnisse im Modellsystem Pappel nachvollziehen zu können. Für den Vektor lagen die Informationen vor, dass er zum *Agrobacterium*-Stamm C58 gehörte und Resistenzen für Rifampicin (auf dem bakteriellen Chromosom des Stamms C58), Kanamycin und Gentamicin trug. Die genannte Publikation enthielt allerdings keine Vektorkarte oder Sequenzdaten, sodass das Plasmid sequenziert werden musste. Die für die Sequenzierung des Überexpressionsvektors A137 verwendeten Primer sind im Anhang aufgeführt. Aus den Sequenzierungen des Plasmids A137 wurden 75 Einzelsequenzen erhalten. Diese wurden in einem Alignment zu einer 13.192 bp langen Consensus-Sequenz zusammengefasst, die im Anhang aufgeführt ist. Unter Zuhilfenahme von bekannten Sequenzen und funktionellen Annotationen wurden funktionelle Sequenzbereiche identifiziert (Tab. 2.5) und eine Vektorkarte erstellt (Abb. 2.5).

Tab. 2.5: Funktionelle Annotationen im Transformationsplasmid A137

Die T-DNA umfasste den Bereich 5503-10127 (farblich hinterlegt). Mit * markiert sind die Gene, die auf dem komplementären Strang kodiert waren. Das Plasmid pGH00.0131 wurde zur Annotierung der Sequenzierungen herangezogen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KF148031>, Zugriff am 18.08.2015), ebenso das Plasmid pLMB51 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JQ895026>, Zugriff am 18.08.2015)

Sequenzbereich	Annotation	Typ	Funktionsbeschreibung
84..355 *	<i>kilA</i>	Gen / Offener Leserahmen	Lethaler Locus (Frisch <i>et al.</i> 1995, aus pGH00.0131)
1667..2461	<i>nptIII</i>	Gen / Offener Leserahmen	Aminoglycosid-Phosphotransferase (aus pGH00.0131)
2758..3906	<i>trfA</i>	Gen / Offener Leserahmen	Plasmid-Replicase (Hellens <i>et al.</i> 2000, aus pGH00.0131)
5503..5526	T-DNA Left Border	Strukturelement	
5580..5710 *	<i>lacI</i>	Gen / Offener Leserahmen	Bestandteil des Lactose-Operons (lac-Operon, aus pGH00.0131)
5711..6011 *	M13 Ori	Gen / Offener Leserahmen	Gen der Phage M13 (Fray <i>et al.</i> 1994, aus pGH00.0131)
6233..6434 *	35S-Terminator	Terminator	Terminator des Blumenkohlmosaikvirus (CaMV)
6461..7156 *	<i>ful</i>	Gen / Offener Leserahmen	Zielgen <i>FRUITFULL</i>
7193..7558 *	35S-Promoter	Promoter	Promoter des Blumenkohlmosaikvirus (CaMV)
8303..8558 *	NOS-Terminator	Terminator	Terminator der Nopalinsynthase aus <i>A. tumefaciens</i>
8948..9743 *	<i>nptII</i>	Gen / Offener Leserahmen	Neomycinphosphotransferase als Resistenzmarker gegen Kanamycin
9756..10063 *	NOS-Promoter	Promoter	Promoter der Nopalinsynthase aus <i>A. tumefaciens</i>
10104..10127	T-DNA Right Border	Strukturelement	
10237..10561 *	<i>tetA</i> , unvollständig	Gen / Offener Leserahmen	Tetracyclin-Resistenzgen (am Ende unvollständig, aus pLMB51)
10565..11242	<i>tetR</i>	Gen / Offener Leserahmen	Tetracyclin-Resistenzgen (aus pLMB51)
11785..12571 *	<i>traF</i>	Gen / Offener Leserahmen	Konjugationsprotein <i>TraF</i> (Fullner <i>et al.</i> 1996, aus pGH00.0131)
12584..13192 + 1..9 *	<i>oriV</i>	Gen / Offener Leserahmen	Vegetativer Replikationsursprung (Young <i>et al.</i> 1985, aus pGH00.0131)

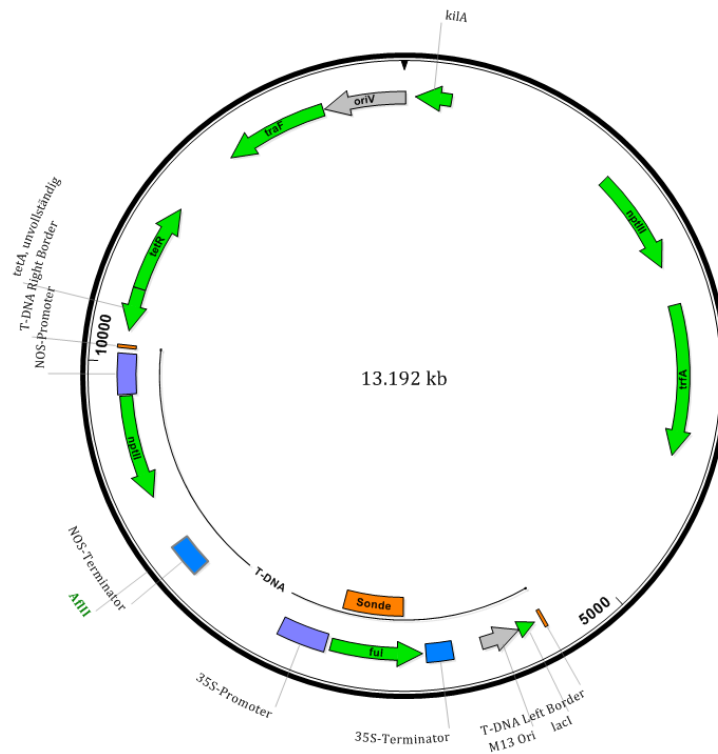


Abb. 2.5: Vektorkarte von Transformationsvektor A137

Das Ti-Plasmid von A137 umfasste insgesamt 13.192 bp. Im Bereich der T-DNA zwischen *Left Border* und *Right Border* waren der Selektionsmarker *NPTII*, flankiert vom NOS-Promoter und -Terminator, und das Zielgen *FUL*, reguliert durch den 35S-Promoter und -Terminator, kodiert. Verzeichnet sind auch die Hybridisierungssonde und das Restriktionsenzym *AflII*, die für das Southern Blot verwendet wurden. Außerhalb der T-DNA waren u. a. weitere Antibiotikumresistenzen und Gene zur Übertragung der T-DNA kodiert.

2.7 *Agrobacterium*-Kulturen

2.7.1 Medien

2.7.1.1 YEB (Yeast Extract Broth)-Medium

Ein Volumen von 1 L YEB-Medium setzte sich zusammen aus 5 g Fleischextrakt, 1 g Hefeextrakt, 5 g Pepton und 5 g Saccharose. Mit deionisiertem Wasser wurde das Volumen auf 1 L aufgefüllt. Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH auf 7,2 eingestellt. Dieser Ansatz wurde autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf unter 60 °C wurden 2 mL MgSO₄ (1 M, sterilfiltriert) hinzugegeben.

2.7.1.2 LB (Lysogeny Broth)-Medium

Zur Herstellung von 1 L LB-Medium wurden 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 10 g Natriumchlorid gemischt und mit deionisiertem Wasser auf ein Volumen von 1 L aufgefüllt. Der pH-Wert wurde auf 7 eingestellt.

2.7.1.3 Vorkultur-Medium für Transformationsvektoren des Stamms GV3101-pMP90RK

Das Vorkultur-Medium, das für die Transformationsvektoren des Stamms GV3101-pMP90RK genutzt wurde, setzte sich zusammen aus YEB-Medium, das mit den folgenden Antibiotika in den genannten Endkonzentrationen versetzt wurde: Rifampicin (100 mg/L), Kanamycin (50 mg/L, Kanamycin-Sulfat),

Gentamicin (25 mg/L, Gentamicin-Sulfat), Streptomycin (300 mg/L, Streptomycin-Sulfat), Spectinomycin (100 mg/L, Spectinomycin-Dihydrochlorid, Pentahydrat).

Rifampicin diente der Selektion auf den *Agrobacterium*-Stamm GV3101. Das Ti-Plasmid wurde durch Gentamicin und Kanamycin selektiert (Hellens *et al.* 2000). Zur Selektion des pLH-Vektors, in dessen *Multiple Cloning Site* das entsprechende Transformationskonstrukt kloniert vorlag, wurde Streptomycin und Spectinomycin eingesetzt.

2.7.1.4 Vorkultur-Medium für Transformationsvektoren des Stamms EHA105

Das Vorkultur-Medium, das für die Transformationsvektoren des Stamms EHA105 genutzt wurde, setzte sich zusammen aus YEB-Medium und den folgenden Antibiotika in den genannten Endkonzentrationen: Rifampicin (100 mg/L) und Spectinomycin (100 mg/L, Spectinomycin-Dihydrochlorid, Pentahydrat).

2.7.1.5 Vorkultur-Medium für die Transformationsvektoren A122 und A137

Für die Transformationsvektoren A122 und A137 lag lediglich der chromosomale Hintergrund des *Agrobacterium*-Stamms vor, nicht die genaue Stammbezeichnung. Die Bakterien wurden mit LB-Medium angezogen, das mit den folgenden Antibiotika in den angegebenen Endkonzentrationen versetzt war:

A122: Rifampicin (50 mg/L), Kanamycin (50 mg/L, Kanamycin-Sulfat), Carbenicillin (100 mg/L);

A137: Rifampicin (50 mg/L), Kanamycin (50 mg/L, Kanamycin-Sulfat), Gentamicin (25 mg/L, Gentamicin-Sulfat).

2.7.2 Glycerin-Stocks

Zur Langzeitlagerung von Bakterienkulturen wurden Glycerin-Stocks angesetzt. Sie waren aus 200 µL Glycerin (99,5%, autoklaviert) und 800 µL Vorkultur zusammengesetzt. Der Ansatz wurde gründlich gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -70 °C eingelagert.

2.7.3 Mini-Präparation von Plasmiden

Die Mini-Präparation zur Plasmid-Isolation wurde nach Knight & Monroe (http://csmbio.csm.jmu.edu/biology/courses/bio480_580/mblab/miniprep.html, Zugriff am 15.08.2015) durchgeführt. Zur Präparation von Plasmiden mit nachstehendem Protokoll wurden die folgenden drei Puffer mit der genannten Zusammensetzung verwendet:

Puffer 1: 50 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 100 µg/mL RNase A, pH 8,0

Puffer 2: 1% SDS; 0,2 M NaOH

Puffer 3: 3 M Kaliumacetat, pH 5,5

Zur Mini-Präparation wurde 1 mL Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß pipettiert und für 20 s bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Der Rückstand wurde mit 100 µL Puffer 1 versetzt und die Zellen durch Vortexen resuspendiert. Zweihundert µL Puffer 2 wurden hinzugefügt. Die Suspension wurde durch mehrmaliges Invertieren gemischt und für mindestens fünf Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 150 µL eiskalter Puffer 3 hinzugegeben und die Probe wieder durch Invertieren gemischt. Nach einer weiteren fünfminütigen Inkubation auf Eis wurde die

Probe 5 s bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß übernommen und mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt und gemischt. Nach 2 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Rückstand mit 200 µL absolutem Ethanol versetzt und erneut durch Invertieren gemischt. Nach 2 min Zentrifugation wurde der Überstand erneut abgenommen, der Rückstand im Gefäß getrocknet und anschließend in 20 µL TE-Puffer (siehe Abschnitt 2.9.1 TE-Puffer) gelöst.

2.8 Genetische Transformation

2.8.1 *Agrobacterium*-vermittelte Transformation von Pappeln

Die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation teilte sich in drei Schritte, die aufeinanderfolgend durchgeführt wurden: Vorkultur der Agrobakterien, Hauptkultur und Transformation, Regeneration von putativ transgenen Pflanzensprossen. Das hier aufgeführte Protokoll basiert im Wesentlichen auf Fladung *et al.* (1997) und wurde vom Autor stark modifiziert.

Vorkultur der Agrobakterien

Aus den Glycerinstocks wurde eine Spatelspitze gefrorene Bakteriensuspension abgekratzt und in ein Zellkulturröhrchen mit 4 mL Vorkultur-Medium überführt. Die Kultur wurde über Nacht bei 28 °C inkubiert, dabei zur Belüftung mit 900 rpm durchgehend geschüttelt.

Hauptkultur und Transformation

Die über Nacht inkubierte Vorkultur der Agrobakterien wurde in 50 mL YEB-Medium überführt und weiterhin bei 28 °C unter beständigem Schwenken bei 200 rpm inkubiert.

Während der Inkubationszeit wurde das Pflanzenmaterial zur Transformation vorbereitet. Dazu wurden beliebig viele Pflanzen aus der *in vitro*-Kultur beerntet. Sie wurden oberhalb des untersten Blattes abgeschnitten und bis zur weiteren Bearbeitung zur Vermeidung von Austrocknung in sterilem Leitungswasser aufbewahrt, bei längerer Wartezeit (> 30 min) in flüssigem 460-Medium.

Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,3-0,8 (in der Regel nach 4,5 bis 6 h) wurde die Agrobakterien-Suspension mit 18 µL Acetosyringon versetzt und für 30 min weiter inkubiert. In dieser Zeit wurden die geernteten Pflanzen mit Scheren und Skalpell fein zerkleinert. Die Blattstücke sollten anschließend eine maximale Größe von 7 mm² und die Sprossstücke eine maximale Länge von 7 mm Länge haben. Das zerkleinerte Pflanzenmaterial wurde nach Ablauf der 30-minütigen Inkubation mit Acetosyringon zur Bakteriensuspension hinzugegeben und in Dunkelheit für maximal 45 min bei 28 °C und 200 rpm geschwenkt. Nach der Inkubation wurde die Suspension über einem feinen Metallsieb abgesehen und die pflanzlichen Rückstände auf sterilem Filterpapier abgetropft. Das Pflanzenmaterial wurde in Petrischalen mit 460-Medium verteilt und für ein bis drei Tage bei 22 °C sowie in Dunkelheit inkubiert.

Regeneration

Nach der ein bis drei Tage andauernden Inkubation wurde das ausgebrachte Pflanzenmaterial zusammengesammelt und gewaschen. Für die benötigte Cefotaxim-Lösung wurden 2 mL Cefotaxim (125 mg/mL, Cefotaxim-Natriumsalz) in 500 mL sterilem Leitungswasser gelöst, um eine Endkonzentration von 500 mg/L zu erreichen. Die Waschung fand in sechs Schritten statt: Einmal für zwei Minuten in etwa 150 mL sterilem Leitungswasser, viermal für zwei Minuten in 150 mL Cefotaxim-Lösung und abschließend ein zweites Mal in 150 mL sterilem Leitungswasser. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pflanzenmaterial wieder auf sterilem Filterpapier abgetropft und anschließend zur Regeneration auf 601-Medium, das mit Cefotaxim und mit einem oder mehreren weiteren Selektionsantibiotika (je nach Transformationsvektor) versetzt wurde, ausgebracht.

Während der Regenerationsphase entstanden mitunter über 100 unabhängige Regenerate. Nicht alle diese Regenerate konnten weiterbearbeitet werden, sodass eine Selektion vorgenommen werden musste (Abb. 2.6). Aus den Explantaten wurden einzelne Regenerate isoliert und zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks auf neues Regenerationsmedium mit denselben Antibiotika in Petrischalen überführt, um die spätere Kontamination mit persistierenden Agrobakterien zu vermeiden.

Nach weiterem Heranwachsen der Regenerate wurden sie in Kulturgefäße mit Regenerationsmedium und Antibiotikumzusatz überführt. Hier wurde die einsetzende multiple Sprossung beobachtet. Von jedem Regenerat wurde ein Spross abgeschnitten und in mit Antibiotika versetztes 460-Medium überführt, nach Bedarf über die Zwischenstufen 601_{1/2} und 601_{1/4} (jeweils mit Antibiotika versetzt). Bei Kultur auf 460-Medium wurde eine Bonitur vorgenommen und die Wüchsigkeit der einzelnen Stecklinge beurteilt. Besonders wüchsige Stecklinge wurden für die weitere Bearbeitung übernommen, ebenso eine Auswahl an gut, mäßig und wenig wüchsigen Pflanzen, sodass jede Phänotypenausprägung berücksichtigt wurde. Die diesen Selektionsstufen unterzogenen Pflanzen wurden durchnummeriert und als unabhängige Sublinien einer Transformationslinie behandelt.

2.8.2 Entsorgung von genetisch verändertem Material und Dekontaminationsmaßnahmen

Genetisch verändertes Material und hiermit in Berührung gekommene Gefäße wurden im Autoklav bei 121 °C für 20 min dekontaminiert und fachgerecht entsorgt bzw. neu aufbereitet. Präparative Metallwerkzeuge wie Pinzetten, Scheren oder Skalpelle wurden im Glasperlensterilisator für min. 10 s auf 260 °C erhitzt. Oberflächen wurden mit 70% Ethanol abgewischt.

2.9 Extraktion von Nukleinsäuren

2.9.1 TE-Puffer

Die extrahierte DNA wurde in TE-Puffer gelagert, da sie hier stabiler war als in Wasser. Der TE-Puffer war zusammengesetzt aus 10 mM Tris und 1 mM EDTA-Dinatriumsalz bei einem pH-Wert von 8,0 (Sambrook *et al.* 1989). Zur Herstellung von 1× TE+RNase wurden 99,99 mL mit 10 µL RNase A (100 mg/µL) versetzt.

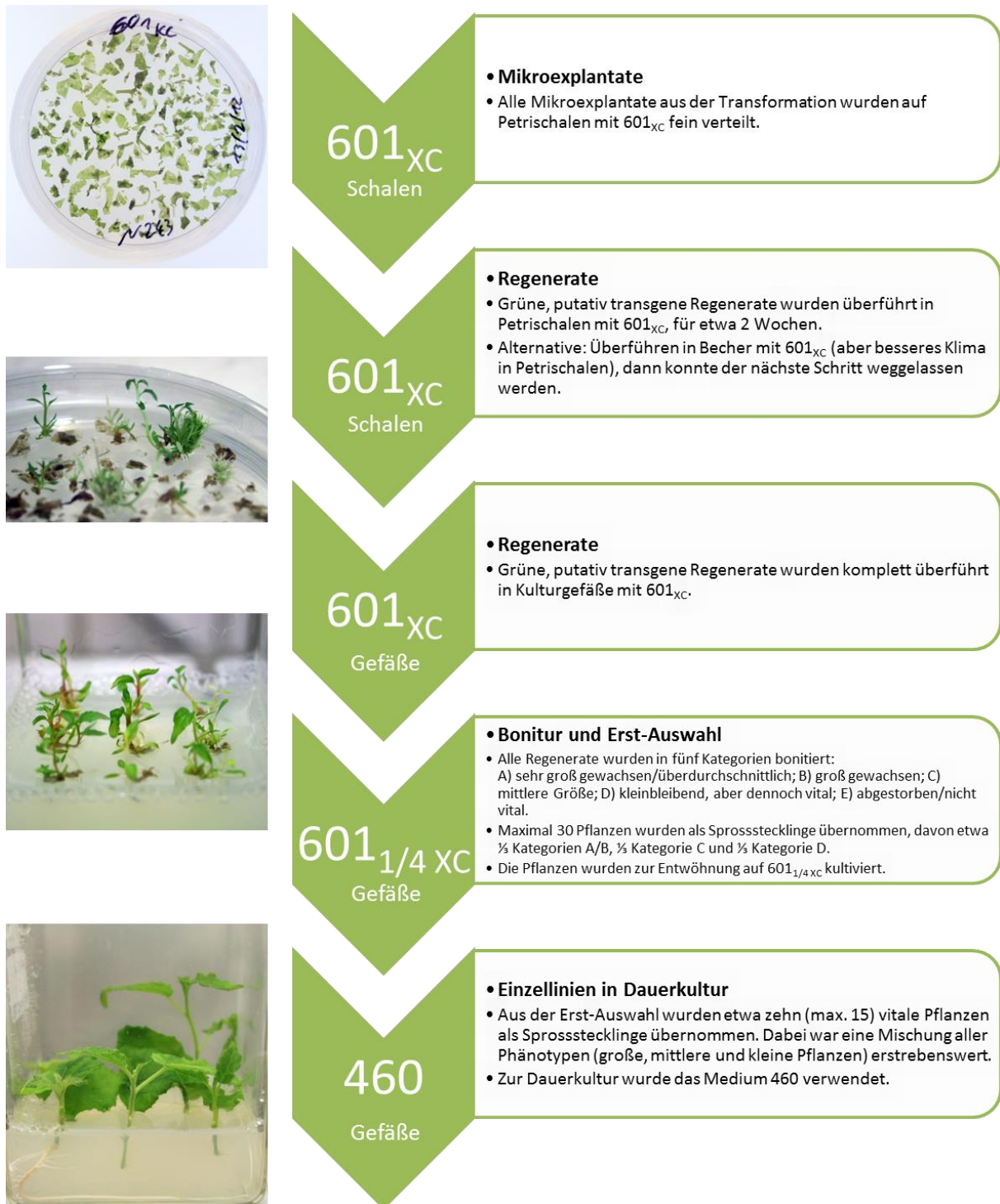


Abb. 2.6: Selektionsschema der Transformationsregenerate

Die einer Transformation entwichenen Regenerate wurden in zwei Stufen selektiert, um eine Auswahl an zu bearbeitenden Pflanzen pro Transformation zu erhalten. Das „X“ bei den Medienangaben, z. B. 601_{XC}, steht für das jeweils passende Selektionsantibiotikum, also Hygromycin und/oder Kanamycin, „C“ für Cefotaxim.

2.9.2 DNA-Extraktion

Der DNA-Extraktion liegt das Protokoll von Dumolin *et al.* (1995) zu Grunde, das teilweise modifiziert wurde. Der Extraktionspuffer (1 L) setzte sich zusammen aus 20 g Alkyltrimethylammoniumbromid (ATMAB), 10 g PVP (M = 40.000 g/mol), 5,8 g EDTA II, 12,1 g Tris HCl und 81,8 g NaCl. Das Volumen wurde mit deionisiertem Wasser auf 1 L aufgefüllt.

Das Probenmaterial wurde zum Aufschluss in 2 mL-Reaktionsgefäße mittels flüssigem Stickstoff (-196 °C) tiefgefroren. Unter der Einwirkung von zwei Stahlkugeln (Durchmesser 5 mm) wurde es in einer Schwingmühle (Fa. Retsch, Haan) zerkleinert (2 min bei 19 Hz). Vor der weiteren Bearbeitung wurden die Stahlkugeln aus den Reaktionsgefäßen entfernt.

Zum noch tiefgefrorenen, zerkleinerten Pflanzenmaterial wurde 1 mL Extraktionspuffer, der zuvor auf 55 °C erwärmt wurde, hingegeben und die Suspension mit einem Vortexmischer gründlich gemischt, sodass das gesamte gefrorene Probenmaterial gelöst war. Nach Hinzugabe von 50 µL Dithiothreitol (DTT, 1 M) wurden die Proben kurz durchmischt. Das Gemisch wurde 1 h bei 55 °C und 400 rpm inkubiert, anschließend 10 min auf Eis. Daran schloss sich eine Trichlormethan-Fällung an, für die 400 µL den Proben hinzugegeben wurde. Die Proben wurden mehrfach invertiert und 20 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für die anschließende Isopropanol-Fällung wurden 600 µL Isopropanol (-20 °C kalt) hinzugefügt und durchmischt. Bei einer Inkubation von mindestens 30 min bei -20 °C fielen Nukleinsäuren aus, die bei einer anschließenden 10-minütigen Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C abgetrennt wurden. Der Überstand wurde verworfen. Das Sediment wurde mit 1 mL 70% Ethanol (-20 °C kalt) gereinigt und per Zentrifugation, 20 min bei 13.000 rpm und 4 °C, wieder gesammelt. Nach dem Verwerfen des Überstands wurde der Rückstand getrocknet und danach in 30-60 µL 1× TE+RNase gelöst. Das verwendete Volumen war dabei abhängig von der Größe des Sediments und die gewünschte DNA-Konzentration. Nach Quellung über Nacht bei -4 °C wurden die Proben zum RNase-Verdau 30 min bei 37 °C inkubiert.

2.9.3 Spektralphotometrische Nukleinsäure-Konzentrationsmessung

Die Konzentrationen von Nukleinsäurelösungen, sowohl DNA- als auch RNA-Lösungen, wurden mit dem Spektralphotometer NanoDrop 1000 3.7.1 (Fa. Thermo-Scientific) gemessen. Das Gerät erstellte ein Extinktionsspektrum und errechnete daraus die Konzentration der Nukleinsäure. Die Reinheit der vorliegenden Nukleinsäuren konnte anhand der Extinktionsquotienten $E_{260/280}$ und $E_{260/230}$ bewertet werden.

Für die Konzentrationsmessung wurden 1,0-1,5 µL Lösung auf den Messteller aufgetragen. Als Nullprobe wurde, je nachdem worin die Nukleinsäuren gelöst wurden, deionisiertes Wasser, 1× TE+RNase oder PEB-Puffer (entspricht 10 mM Tris-HCl, pH 8,5, siehe Abschnitt 2.10.6 Synthese der Sonden für Southern Blots/Gelelution) verwendet. Nach jeder Messung wurde der Messteller gereinigt.

2.9.4 RNA-Extraktion

2.9.4.1 Handprotokoll

Das Protokoll zur RNA-Extraktion basiert auf Chang *et al.* (1993). Der zur RNA-Extraktion benötigte Extraktionspuffer setzte sich zusammen aus 2% Hexadecyltrimethylammoniumbromid,

2% Polyvinylpyrrolidon (PVP), 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 25 mM EDTA und 2 M NaCl. Die Substanzen wurden in RNase-freiem Wasser gelöst. Die SSTE-Lösung besteht aus 1 M NaCl, 0,5% SDS, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) und 1 mM EDTA. Alle Bestandteile wurden in RNase-freiem Wasser gelöst.

Für die RNA-Extraktion wurde frisches Pflanzenmaterial geerntet und direkt in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Mittels einer Schwingmühle (Fa. Retsch) und zwei Stahlkugeln (5 mm Durchmesser) wurde das Pflanzenmaterial für mindestens 2:30 min bei 21-23 Hz pulverisiert.

Der Extraktionspuffer wurde auf 65 °C erhitzt und pro 1 mL mit 20 µL β-Mercaptoethanol und 0,54 µL Spermidin versetzt. Von diesem Gemisch wurde jeweils 1 mL zu jeder Probe hinzupipettiert und mit einem Vortexmischer gründlich durchmischt. Die Proben wurden danach für 10 min bei 65 °C im Inkubationsmischer mit 400 rpm inkubiert. Hinterher wurden die Proben noch einmal mit dem Vortexmischer durchgemischt. Die Proben wurden für 2 min bei 16.500 G zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues 2 mL-Reaktionsgefäß überführt. Das gleiche Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) wurde hinzugegeben und durch Invertieren vermischt. Es folgte eine Zentrifugation der Proben für 20 min bei 16.500 G. Der wässrige Überstand wurde abgenommen, in ein neues 2 mL-Reaktionsgefäß überführt, erneut mit dem gleichen Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) versetzt, durchmischt und für 20 min bei 16.500 G zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde anschließend abgenommen und in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Dieses Volumen wurde mit 1/3 Volumen 8 M LiCl vermischt und vorsichtig durch Invertieren gemischt. Über Nacht wurde die RNA dann bei 4 °C gefällt.

Die gefällten Nukleinsäuren wurden am nächsten Tag für 20 min mit 18.000 G bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Der Niederschlag wurde in 200 µL SSTE gelöst. Zur besseren Löslichkeit wurde die Suspension für 2:30 min mit 400 rpm im Inkubationsmischer inkubiert. Es wurden 200 µL Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) hinzugegeben und mit dem vorgelegten Volumen durch Invertieren gemischt. Durch 20 min Zentrifugation bei 16.500 G und 4 °C wurden die Phasen getrennt; davon wurde der Überstand abgenommen und in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Das doppelte Volumen Ethanol (absolut, -20 °C kalt) wurde hinzugegeben, durch Invertieren gemischt und zur RNA-Fällung über Nacht bei -20 °C inkubiert.

Die Proben wurden anschließend für 20 min bei 18.000 G und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, ohne das fragile Sediment aufzunehmen. Das Sediment wurde mit 1 mL 70% Ethanol gewaschen und mit 18.000 G bei 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde abermals vorsichtig abgenommen. Die gefällten Nukleinsäuren wurden für mindestens 1 h offen in einer Sterilwerkbank getrocknet und hinterher in 30 µL RNase-freiem Wasser aufgenommen. Die Proben wurden spektralphotometrisch gemessen und bei -70 °C eingelagert.

2.9.4.2 RNA-Extraktionskit

Zur schnellen Extraktion von RNA wurde das „innuPREP Plant RNA Kit“ (Fa. Analytik Jena, Jena) verwendet. Maximal 100 µg Pflanzengewebe wurde in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Mittels einer Schwingmühle (Fa. Retsch) und zwei Stahlkugeln (5 mm Durchmesser) wurde das Pflanzenmaterial für 1:30 min bei 19-21 Hz pulverisiert.

Anschließend wurde auf das Pflanzenmaterial 450 µL Lysis Solution RL gegeben und durch Vortexen vermischt, bis das Material aufgetaut und gelöst vorlag. Nicht-lysiertes Material wurde durch 1 min Zentrifugieren bei 18.000 G abgeschieden. Der Überstand wurde auf die Filtersäule D übertragen und für 2 min bei 10.000 G zentrifugiert. Der aufgefangene Durchfluss wurde mit 400 µL 70% Ethanol vermischt und auf die Filtersäule R übertragen. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 2 min bei 10.000 G. Die Filtersäule R wurde mit 500 µL Waschlösung HS benetzt und 1 min bei 10.000 G zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Es folgten zwei Reinigungsschritte mit 650 µL Waschlösung LS und jeweils 1 min Zentrifugation bei 10.000 G. Die Durchflüsse wurden verworfen. Mit geöffnetem Deckel wurden die Säulen einige Minuten getrocknet, bevor 40 µL Nuklease-freies Wasser zur Elution aufgetragen wurden. Das Volumen wurde 1 min inkubiert, bevor es für 1 min bei 6.000 G abzentrifugiert wurde. Zur Steigerung der Ausbeute wurde das Volumen erneut auf die Filtermembran gegeben und die Zentrifugation wiederholt. Die Proben wurden spektralphotometrisch gemessen und bei -70 °C eingelagert.

2.9.5 DNase-Verdau der isolierten RNA

Die isolierte RNA musste nach der Extraktion einem DNase-Verdau unterzogen werden, sodass die gDNA nicht als Template in der qRT-PCR dienen konnte (Udvardi *et al.* 2008). Hierfür wurde das TURBO DNA-free Kit (Fa. Ambion/life technologies, Carlsbad, USA) verwendet, da hier durch die „*Inactivation Solution*“ alle Reaktionsbestandteile abgeschieden werden und am Ende die reine RNA vorliegt.

Zum DNase-Verdau wurde ein Reaktionsmix aus 28 µL RNA-Isolat, 3,3 µL Reaktionspuffer und 1,0 µL DNase-Lösung angesetzt und bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Nach 30 min Inkubation wurde in jede Probe 1 µL DNase I nachgefüllt. Die Inkubation wurde anschließend für 30 min fortgesetzt. Zuletzt wurden 6,6 µL *Inactivation Solution* hinzugefügt und mit der Probe gemischt. Nach fünf Minuten Inkubation bei Raumtemperatur, während der die Proben immer wieder sanft durchmischt wurden, wurden die Proben bei für 1:30 min bei 10.000 G zentrifugiert. Die *Inactivation Solution* sammelte sich am Boden des Reaktionsgefäßes. Der Überstand wurde abgenommen, spektralphotometrisch gemessen und bei -70 °C eingelagert.

2.10 DNA-Analysen

2.10.1 Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis von Resistenzgenen

Zur Selektion von transgenen Pflanzen wurden die Antibiotikaresistenzen gegen Kanamycin und Hygromycin als Selektionsmarker (Howe *et al.* 1991, Fladung *et al.* 1997). Die Kanamycinresistenz wurde durch die Neomycinphosphotransferase *NPTII* vermittelt und durch die untenstehende, 804 bp umfassende Sequenz kodiert. Darin markiert sind Sequenzen für die Primer #317 (orange markiert), #318 (komplementäre Sequenz, unterstrichen), #343 (grün markiert) und #344 (komplementäre Sequenz, blau markiert), die in PCR-Reaktionen eingesetzt wurden:

ATGGGAGCTT GGATTTGAACA AGATGGATTG CACGCAGGTT CTCCGCGCCG TTGGGTGGAG AGGCTATTCTG GCTATGACTG
 GGCACAACAG ACAATCGGCT GCTCTGATGC CGCCGTGTTT CGGCTGTGAG CGCAGGGGCG CCCGGTTCTT TTTGTCAAGA
 CCGACCTGTC CGGTGCCCTG AATGAACTGC AGGACGAGGC AGCGCGGCTA TCGTGGCTGG CCACGACGGG CGTTCCTTGC
 GCAGCTGTGC TCGACGTTGT CACTGAAGCG GGAAGGGACT GGCTGCTATT GGGCGAAGTG CCGGGGCGAGG ATCTCCTGTC
 ATCTCACCTT GCTCCTGCCG AGAAAGTATC CATCATGGCT GATGCAATGC GGC GGCTGCA TACGCTTGAT CCGGCTACCT
 GCCATTTCGA CCACCAAGCG AAACATCGCA TCGAGCGAGC ACGTACTCGG ATGGAAGCCG GTCTTGTGCA TCAGGATGAT
 CTGGACGAAG AGCATCAGGG GCTCGCGCCA GCCGAACTGT TCGCCAGGCT CAAGGC GCGC ATGCCCGACG GCGAGGATCT
 CGTCGTGACC CATGGCGATG CCTGCTTGCC GAATATCATG GTGGAAAATG GCCGCTTTTC TGGATTCATC GACTGTGGCC
 GGCTGGGTGT GGGGACCGC TATCAGGACA TAGCGTTGGC TACCCGTGAT ATTGCTGAAG AGCTTGGCGG CGAATGGGCT
 GACCGCTTCC TCGTCTTTA CGGTATCGCC GCTCCCGATT CGCAGCGCAT CGCCTTCTAT CGCCTTCTTG ACGAGTTCTT
 CTGA

Die folgende, 1.026 bp umfassende Sequenz kodiert die für die Hygromycinresistenz verantwortliche Hygromycinphosphotransferase *HPT*. Darin markiert sind Sequenzen für Primer #337 (grün markiert) und #338 (komplementäre Sequenz, blau markiert), die in PCR-Reaktionen eingesetzt wurden:

ATGAAAAGC CTGAACTCAC CGCGACGTCT GTCGAGAAGT TTCTGATCGA AAAGTTCGAC AGCGTCTCCG ACCTGATGCA
 GCTCTCGGAG GCGGAAGAAT CTCGTGCTTT CAGCTTCGAT GTAGGAGGGC GTGGATATGT CCTGCGGGTA AATAGCTGCG
 CCGATGGTTT CTACAAAGAT CGTTATGTTT ATCGGCACTT TGCATCGGCC GCGCTCCCGA TTCCGGAAGT GCTTGACATT
 GGGGAATTCA GCGAGAGCCT GACCTATTGC ATCTCCCGCC GTGCACAGGG TGTCACGTTG CAAGACCTGC CTGAAACCGA
 ACTGCCCGCT GTTCTGCAGC CGGTGCGCGA GGCCATGGAT GCGATCGCTG CGGCCGATCT TAGCCAGACG AGCGGGTTCG
 GCCATTTCGG ACCGCAAGGA ATCGGTCAAT ACACTACATG GCGTGATTTT ATATGCGCGA TTGCTGATCC CCATGTGTAT
 CACTGGCAAA CTGTGATGGA CGACACCGTC AGTGCCTCCG TCGCGCAGGC TCTCGATGAG CTGATGCTTT GGGCCGAGGA
 CTGCCCGGAA GTCCGCGACC TCGTGCACGC GGATTTGCGC TCCAACAATG TCCTGACGGA CAATGGCCGC ATAACAGCGG
 TCATTGACTG GAGCGAGGCG ATGTTGCGGG ATTCCCAATA CGAGGTCGCG AACATCTTCT TCTGGAGGCC GTGGTTGGCT
 TGTATGGAGC AGCAGACGCG CTA CTCTCGAG CGGAGGCATC CGGAGCTTGC AGGATCGCCG CGGCTCCGGG CGTATATGCT
 CCGCATTGTT CTTGACCAAC TCTATCAGAG CTTGTTGAC GGCAATTTTC ATGATGCAGC TTGGGCGCAG GGTGATGCG
 ACGCAATCGT CCGATCCGGA GCCGGGACTG TCGGGCGTAC ACAAATCGCC CGCAGAAGCG CGGCCGTCTG GACCGATGCG
 TGTGTAGAAG TACTCGCCGA TAGTGGAAAC CGACGCCCCA GCACTCGTCC GAGGGCAAAG GAATAG

Als Primer zum Nachweis des Kanamycin-Resistenzgens *NPTII* wurden das Primerpaar #317 und #318 eingesetzt, das ein 776 bp langes Fragment amplifizierte, oder #343 und #344, das ein 737 bp langes Fragment amplifizierte:

#317 5' TTG AAC AAG ATG GAT TGC ACG 3'
 #318 5' AAG AAG GCG ATA GAA GGC GA 3'
 #343 5' TTG GGT GGA GAG GCT ATT CGG 3'
 #344 5' GAA GGC GAT AGA AGG CGA TGC 3'

Als Primer zum Nachweis des Hygromycin-Resistenzgens *HPT* wurden die Primer #337 und #338 eingesetzt, die ein 988 bp langes Fragment amplifizierten:

#337 5' AAA GCC TGA ACT CAC CGC GA 3'
 #338 5' TCG GTT TCC ACT ATC GGC GA 3'


Die Zusammensetzung der PCR (Tab. 2.6) sowie ihr Thermoprofil (Tab. 2.7) sind nachfolgend aufgeführt:

Tab. 2.6: PCR-Zusammensetzung zum Nachweis des Selektionsmarkers

Bestandteil	Stockkonzentration	PCR-Konzentration	Volumen [μL]
PCR-Puffer BD	10×	1×	2,50
MgCl ₂	25 mM	2,0 mM	2,00
dNTP-Mix	10 mM	0,2 mM	0,50
Forward-Primer	10 μM	0,4 μM	1,00
Reverse-Primer	10 μM	0,4 μM	1,00
DMSO	100%	2%	0,50
DNA-Polymerase	5 U/ μL	0,6 U/ μL	0,12
H ₂ O			15,88
Gesamtvolumen			25,00

Tab. 2.7: PCR-Thermoprofil zum Nachweis des Selektionsmarkers

Die *Annealing*-Temperatur T_A für den Nachweis der Kanamycinresistenz lag bei 57 °C (Primerpaar #317 und #318) bzw. 60 °C (Primerpaar #343 und #344), für den Nachweis der Hygromycinresistenz bei 58 °C. Die Zyklenzahl variierte zwischen 35 und 40.

Temperatur [°C]	Zeit [min]	Vorgang	Zyklen
94,0	2:00	Initiale Denaturierung	
94,0	0:30	Denaturierung	
T_A	0:45	Primer- <i>Annealing</i>	
72,0	1:30	Elongation	
72,0	5:00	Abschluss-Elongation	
8,0	∞	Lagerung	

2.10.2 Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis der Zielgene

Der Transformationserfolg wurde nicht nur mit dem Nachweis des Resistenzmarkers dokumentiert, sondern auch mit dem Nachweis des Zielgens der T-DNA. Als Zielgen wird in dieser Arbeit das neben dem Selektionsmarker in den Empfängerorganismus übertragene Gen bezeichnet. Für den Nachweis wurden zahlreiche Primer auf die Sequenzen angepasst, mit denen PCRs durchgeführt wurden (Tab. 2.8). Die PCR-Produkte wurden per Gelelektrophorese aufgetrennt.

Tab. 2.8: Primer zum Nachweis der Zielgene in den putativ transgenen Linien

Primer-Nr.	Sequenz	Primerlänge	Erfolgreich verwendete <i>Annealing</i> -Temperatur T_A [°C]
#31	ATC GTT GAA GAT GCC TCT GC	20 bp	53 / 57
#31b	ATC GTT CAA GAT GCC TCT AC	20 bp	57 / 56
#437	GGA AGT TCA TTT CAT TTG GAG AG	23 bp	56 / 58
#438	AAA TAG CGA TCA TAG CGT TCA AGT	24 bp	56 / 57 / 58
#439	GCT GAC TCG ATC CTT AGT ATG C	22 bp	57
#1191	CTT GAT CAT TGG AGG TAC TGG	21 bp	53 / 54
#1192	TGA TCA AGG TAC TCT TCC ACG	21 bp	53
#1193	AAT CCT TGG CCG AGT ACT AC	20 bp	52
#1197	ATG GCC ACT GTT GAG GTT GTG	21 bp	53
#1228	GGG TTG AAG AAA GCT GGT GC	20 bp	53
#1232	CCC CAC TTT CGC CTT GGT TA	20 bp	53
#1236	AGA ATG CAA CAA GCA GAC AAG	21 bp	53 / 58
#1237	CCA ATG AAC AAT TGC GTC TCT	21 bp	35 / 38
#1241	AAC AGA ACT CGC CGT AAA GAC	21 bp	54 / 56
#1242	GAG AGG TAG GGT TCA GTT GAA	21 bp	54

Tab. 2.8: Primer zum Nachweis der Zielgene in den putativ transgenen Linien (Fortsetzung)

Primer-Nr.	Sequenz	Primerlänge	Erfolgreich verwendete Annealing-Temperatur T _A [°C]
#1243	CCA GGT GTT GAA GTT CTT TGT A	22 bp	56
#1244	GAG AGG AAA GAC TCA GAT GAA	21 bp	54,5 / 56
#1245	TCT CCA ACT GTT GTA GGT CAT	21 bp	54 / 56
#1360	ACC TCC TCG GAT TCC ATT GC	20 bp	53
#1361	GGA TCT GAG CTA CAC ATG C	19 bp	52 / 53 / 54
#1365	AGG GAG ATT CAC AGG TCG TG	20 bp	53
#1368	CAA AGA TAC AGT CTC AGA AGA CC	23 bp	53 / 54,5
#1369	GGG TTT CTT ATA TGC TCA ACA C	22 bp	53
#1413	GGC GAT GCC TTA AAT AAA GAT A	22 bp	57
#1414	CCA CAA GCT GAC TGC TCT AT	20 bp	57
#1415	AGC CAC AAT CAG CAT GAT ATG	21 bp	57 / 58
#1416	GGG AAG CGT GTT CCA AAA CT	20 bp	57 / 58
#1417	TCC TCA AAG GAC GTT TGT CC	20 bp	57 / 58
#1446	AGA AGG CTG AGG CTT TGA GAG G	22 bp	53
#1447	GCA ATG AGT CTC CTG ATC GAT GG	23 bp	53
#1448	GAG AGT CGA AGA GTC ACA ACA G	22 bp	53
#1573	GGT CTG GTT TGC TCA AGA AAG C	21 bp	56
#1847	CAT CTC TGG AGG AGG TTA AGC	21 bp	56


Die Zusammensetzung der PCR (Tab. 2.9) sowie ihr Thermoprofil (Tab. 2.10) sind nachfolgend aufgeführt:

Tab. 2.9: PCR-Zusammensetzung zum Nachweis der Zielgene

Bestandteil	Stockkonzentration	PCR-Konzentration	Volumen [µL]
PCR-Puffer BD	10×	1×	2,50
MgCl ₂	25 mM	2,0 mM	2,00
dNTP-Mix	10 mM	0,2 mM	0,50
Forward-Primer	10 µM	0,4 µM	1,00
Reverse-Primer	10 µM	0,4 µM	1,00
DMSO	100%	2%	0,50
DNA-Polymerase	5 U/µL	0,6 U/µL	0,12
H ₂ O			15,88
Gesamtvolumen			25,00

Tab. 2.10: PCR-Thermoprofil zum Nachweis der Zielgene

Die Annealing-Temperatur T_A variierte je nach eingesetztem Primerpaar und ist Tab. 2.8 zu entnehmen. Die Zyklenzahl variierte zwischen 35 und 40.

Temperatur [°C]	Zeit [min]	Vorgang	Zyklen
94,0	2:00	Initiale Denaturierung	
94,0	0:30	Denaturierung	
T _A	0:45	Primer-Annealing	
72,0	1:30	Elongation	
72,0	5:00	Abschluss-Elongation	
8,0	∞	Lagerung	

2.10.3 Gelelektrophorese

Die Zusammensetzung des 0,5× Tris-Borat-EDTA-Laufpuffers (TBE) in der Gelelektrophorese und Grundlösung für die Agarosegele wurde Sambrook *et al.* (1989) entnommen. Zunächst wurde eine 10× konzentrierte TBE-Stammlösung angesetzt, die folgendermaßen zusammengesetzt war: 60,5 g Tris, 30,9 g Borsäure, 3,7 g EDTA. Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8,3 eingestellt und das Volumen mit deionisiertem Wasser auf 1 L aufgefüllt. Vor Verwendung wurde die Stammlösung 1:20 verdünnt.

Für die Herstellung des Elektrophoresegels wurde die errechnete Menge Agarose, zwischen 1,0 und 2,0%, abgewogen und mit dem vorgesehenen Volumen an 0,5× TBE-Puffer versetzt. In einem Mikrowellenofen wurde die Agaroselösung aufgeköcht und auf 60 °C abgekühlt. Anschließend wurden 2,5 µL Roti Gel Stain (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) pro 100 mL Agarosegel hinzugegeben. Dieser DNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoff ermöglicht später die Kontrolle des Elektrophoreseverlaufs und die Identifizierung der aufgetrennten PCR-Produkte. Die angefertigte Mischung wurde in die Elektrophoreseform gegossen, wo sie abkühlte und erstarrte.

Zum Beladen des festen Agarosegels wurde Orange G-Ladepuffer verwendet. Von dem Ladepuffer wurde eine 6× konzentrierte Stammlösung aus 30% Saccharose und 1% Orange G-Farbstoff (Fa. Sigma, St. Louis, USA) hergestellt. Die Feststoffe wurden in deionisiertem Wasser gelöst. Die gebrauchsfertige Lösung war eine Verdünnung aus 1 µL Stammlösung und 5 µL Wasser. Von diesem 1× Orange G-Ladepuffer wurden 5 µL mit 5 µL PCR-Produkt vermischt. Das Gesamtvolumen von 10 µL pro Probe wurde auf das Elektrophoresegel aufgetragen. Als DNA-Fragmentlängenmarker wurden 5 µL vom „SmartLadder“ der Fa. Eurogentec verwendet (Abb. 2.7).

Das beladene Elektrophoresegel wurde bis zur gewünschten Auftrennung, mindestens aber 1 h, bei 110 V laufen gelassen. Anschließend wurde das Gel in einer Dokumentationsapparatur der Fa. Intas (Göttingen) unter UV-Bestrahlung fotografisch aufgenommen.

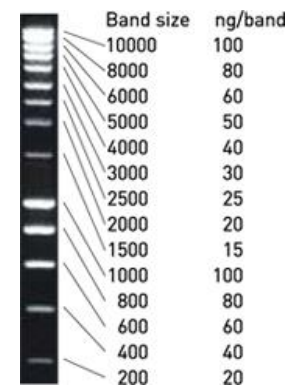


Abb. 2.7: DNA-Fragmentlängenmarker „SmartLadder“ (Fa. Eurogentec, Köln)

2.10.4 Southern Blot

Zur Quantifizierung der Anzahl, mit der Kopien der T-DNA von den Vektoren durch die Transformationen ins Pflanzengenom integriert wurden, wurden Southern Blots durchgeführt (Southern 1975).

Restriktion

Zu Beginn des Southern Blots wurde die DNA mittels Restriktionsenzymen in kleinere Fragmente zerlegt. Die Auswahl der Enzyme war durch die Restriktionssequenzen in der Sequenz der T-DNA bestimmt. Für das gewählte Enzym sollte nur eine Schnittstelle vorhanden sein und diese wiederum außerhalb des Sequenzbereichs, in dem die später verwendete Sonde lag. Es war erstrebenswert, möglichst kleine Fragmente zu erhalten, die in der anschließenden Elektrophorese bis in die Mitte des Agarosegels ziehen und nicht am oberen Rand des Gels zurückbleiben. Hier könnten diese größeren Fragmente leicht mit nicht-verdauter DNA verwechselt werden. Um möglichst kleine DNA-Fragmente zu erhalten, wurden Enzyme ausgewählt, für die im Genom von *P. trichocarpa* (Version 3.0) eine möglichst hohe Anzahl an

Restriktionsschnittstellen ermittelt wurden (B. Kersten, Thünen-Institut für Forstgenetik, unveröffentlicht). Tab. 2.11 zeigt die Auswahl der Restriktionsenzyme für jeden der verwendeten Transformationsvektoren.

Tab. 2.11: Zum Southern Blot eingesetzte Restriktionsenzyme

Die Häufigkeit der Sequenzmotive im Genom von *P. trichocarpa* (Tuskan *et al.* 2006) wurde von B. Kersten (Thünen-Institut für Forstgenetik, unpubliziert) ermittelt. Der senkrechte Strich im Sequenzmotiv markiert die Schnittstelle des Restriktionsenzym.

Restriktionsenzym	Inkubations-temperatur	Sequenzmotiv	Motivhäufigkeit	Hiermit restringierte Vektoren
<i>Afl</i> III	37 °C	C TTAAG	83.684	A137, A141
<i>Ase</i> I	37 °C	AT TAAT	485.049	A199, A226
<i>Bsp</i> EI	37 °C	T CCGGA	24.924	A179, A180
<i>Eco</i> RI	37 °C	G AATTC	118.959	A179, A180, A194, A200, A228, A229, A231
<i>Eco</i> RV	37 °C	GAT ATC	91.863	A198
<i>Sac</i> I	37 °C	GAGCT C	49.957	A122, A137, A180, A185, A194, A200, A201, A204
<i>Ssp</i> I	37 °C	AAT ATT	616.295	A210, A211, A220, A221, A225, A227, A230, A232
<i>Xho</i> I	37 °C	C TCGAG	42.323	A156

Zur Restriktion wurden 20 µg DNA mit 2 µL 10× Reaktionspuffer und 2 µL Restriktionsenzym versetzt. Die Endkonzentration des Enzyms sollte 1 U pro 1 µg DNA betragen. Der Ansatz wurde mit deionisiertem Wasser auf 20 µL aufgefüllt. Die DNA der Transformationsplasmide wurde im Southern Blot als Positivkontrolle verwendet. Von Plasmid-DNA wurden nur 100 ng für die Restriktion verwendet. Hier wurde das Volumen an Restriktionsenzym auf 1 µL reduziert, sodass das Wasservolumen angepasst wurde. Die Inkubation erfolgte bei der vom Restriktionsenzym vorgegebenen Temperatur für 16 h im Heizblock.

Elektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde ein 1,5% Agarose-TBE-Gel (200 mL) gegossen und mit 5 µL Roti Gel Stain angefärbt (siehe Abschnitt 2.10.3 Gelelektrophorese). Der Restriktionsansatz wurde mit 2 µL Ladepuffer (Tab. 2.12) versetzt und das gesamte Probenvolumen (22 µL) auf das Agarosegel aufgetragen, zusätzlich 5 µL DIG-Marker II und 5 µL SmartLadder-Größenmarker. Der DIG-Marker war später auf dem Biolumineszenzfilm zu erkennen, der SmartLadder-Größenmarker wurde zur Validitätsüberprüfung der Elektrophorese eingesetzt.

Die Elektrophorese teilte sich in eine 15-minütige Einlaufphase bei 50 V und einer Hauptlaufphase bei 100 V. Nach dem Lauf wurde unter UV-Bestrahlung ein Foto aufgenommen, um den Erfolg der elektrophoretischen Auftrennung und des Restriktionsverdaus abzusichern.

Tab. 2.12: Zusammensetzung des Ladepuffers für die Southern Blot-Elektrophorese

Volumen	Bestandteil
2 mL	Glycerin (100%)
16 µL	EDTA (0,5 M)
32 mg	Xylencyanol
32 mg	Bromphenolblau
ad. 8 mL	deionisiertes H ₂ O

Gel-Vorbereitung

Vor dem Blotting wurde das Elektrophoresegel in unterschiedlichen Puffern und Lösungen (Tab. 2.13) folgendermaßen inkubiert: Alle Inkubationen wurden auf einem Taumelschüttler bei Raumtemperatur durchgeführt. Zur Depurinierung der DNA wurde das Elektrophoresegel in 0,25 M HCl für 7-8 min inkubiert. Die vollständige Depurinierung wurde beim Farbumschlag der unteren Markerbande des Ladepuffers von blau nach gelb erreicht. Es folgte die Denaturierung der DNA, für die das Gel zweimal für je 30 min in Denaturierungspuffer inkubiert wurde. Es folgten zwei Neutralisierungsschritte für je 30 min in Neutralisationspuffer. Zur Vorbereitung auf das Blotting wurde das Elektrophoresegel für 5 min in 10× SSC gespült.

Tab. 2.13: Zur Gel-Vorbereitung benötigte Puffer und Lösungen

Denaturierungslösung, 1 L	Neutralisationspuffer, 1 L	Salzsäure HCl, 1 M
20,0 g NaOH-Pellets	121,14 g Tris	83 mL HCl (37%)
87,6 g NaCl	87,6 g NaCl	917 mL H ₂ O, deionisiert
ad. 1 L H ₂ O, deionisiert	ad. 1 L H ₂ O, deionisiert	Um die verwendete Konzentration von
Die Lösung wurde auf pH 13 eingestellt.	Der Puffer wurde mit konzentrierter Salzsäure auf pH 7,4 eingestellt.	0,25 M zu erreichen, wurden 250 mL 1 M HCl mit 750 mL H ₂ O gemischt.

Blotting

Beim Blotting wurde die DNA aus dem Elektrophoresegel durch Flüssigkeitssog auf eine Nylonmembran übertragen. Dazu wurde in die beiden Flüssigkeitsreservoirs einer Elektrophoresekammer 10× SSC gefüllt und darin die Enden eines mit 10× SSC getränkten Zellstoffpapiers eingetaucht. Auf die Mitte des Zellstoffs wurden vier weitere Lagen Zellstoffpapier gelegt, die ebenfalls mit 10× SSC getränkt wurden, darauf das Agarosegel mit der Oberseite nach unten. Auf die bisherige Rückseite des Gels wurde eine zugeschnittene Nylonmembran aufgelegt und mit vier Lagen Zellstoffpapier, das mit 2× SSC getränkt wurde, überschichtet. Darauf wurden trockene, saugfähige Papiertücher gestapelt und mit einer Glasplatte und einem Bleigewicht beschwert (Abb. 2.8). Das Blotting wurde über Nacht, aber mindestens 16 h, durchgeführt. Anschließend wurden die vollgesaugten Papiertücher gegen trockene Tücher ausgetauscht und der Blot für etwa 1,5 h fortgesetzt.

UV-Crosslinking

Um die DNA irreversibel auf der Nylonmembran zu fixieren, wurde die Membran beidseitig mit einem UV Stratalinker 2400 (Fa. Stratagene) innerhalb von 45 s mit 120 mJ bestrahlt.

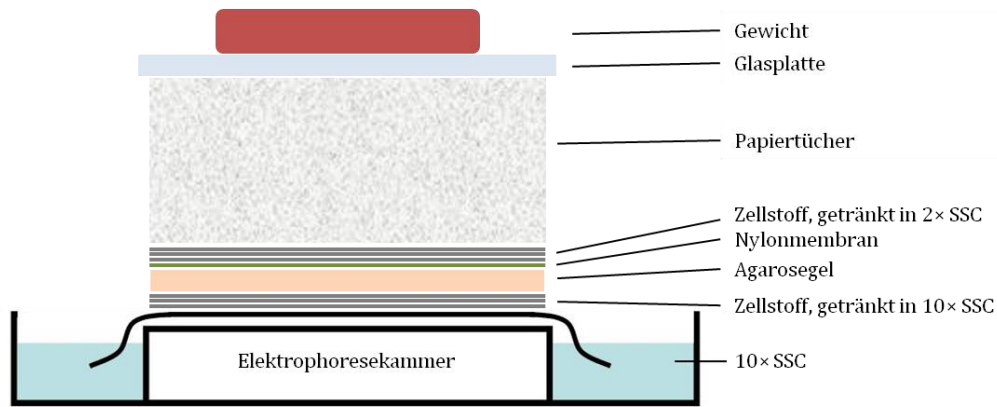


Abb. 2.8: Schematischer Aufbau des Southern Blots

Durch Kapillarkräfte wird die hochkonzentrierte 10× SSC-Lösung von den Reservoirs in die Papiertücher gesaugt. Hierbei wurde die DNA nach der Elektrophorese vom Agarosegel auf die Nylonmembran übertragen. Die Glasplatte sorgte für die gleichmäßige Verteilung des Drucks, der durch das Gewicht auf den Blotting-Aufbau übertragen wird.

Prähybridisierung

Die Prähybridisierungslösung (Tab. 2.14) wurde vor der Verwendung auf 42 °C erwärmt. Die Membran wurde in einer Kunststoffschale vollständig mit Prähybridisierungslösung bedeckt und darin für 3-6 h im Hybridisierungsofen bei 42 °C geschwenkt. Um das Entweichen von schädlichen Dämpfen zu vermeiden, wurde die Schale in einem Kunststoffbeutel verpackt.

Tab. 2.14: Zusammensetzung der Prähybridisierungslösung

Volumen	Inhaltsstoff
25 mL	20× SSC
20 mL	10% <i>Blocking Solution</i>
1 mL	10% Lauroylsarkosin
1 mL	0,5% Hefe-RNA
50 mL	Formamid
2 mL	10% SDS
1 mL	deionisiertes Wasser

Bei der Zusammensetzung der Prähybridisierungslösung ist zu beachten, dass 100 mL 0,5% Hefe-RNA sich aus 500 mg Hefe-RNA und DEPC-behandeltem Wasser (siehe Abschnitt 2.11.1 Denaturierende Gelelektrophorese) zusammensetzten. Da die RNA schwer löslich war, wurde heißes Wasser verwendet. Wenn nötig, wurde die Löslichkeit durch Zugabe von einigen Tropfen 1 M NaOH erhöht.

Hybridisierung

Während der Hybridisierung band die Sonde an die komplementären Sequenzfragmente. Die Sonde wurde wie in Abschnitt 2.10.6 hergestellt und zur direkten Verwendung in Prähybridisierungslösung aufgenommen. Dazu wurden 50 ng Sonde mit 1 mL Prähybridisierungslösung vermischt und bei -20 °C gelagert.

Für die Durchführung der Hybridisierung wurde ein 1 mL-Aliquot der Sonde aufgetaut und 5 min bei 95 °C denaturiert, anschließend mindestens 1 min auf Eis gekühlt. Gleichzeitig wurde das sogenannte „Hybridisierungssandwich“ (Abb. 2.9) aufgebaut. Die Membran wurde in einer Kunststoffolie platziert

und mit dem Sondenaliquot auf der gesamten Fläche benetzt. Dann wurde das Hybridisierungssandwich verschlossen und in einen dichten Plastikbeutel eingewickelt, um das Entweichen schädlicher Dämpfe zu vermeiden. In dieser Form wurde der gesamte Aufbau über Nacht bei 42 °C im Hybridisierungssofen inkubiert (Fladung & Ahuja 1995).

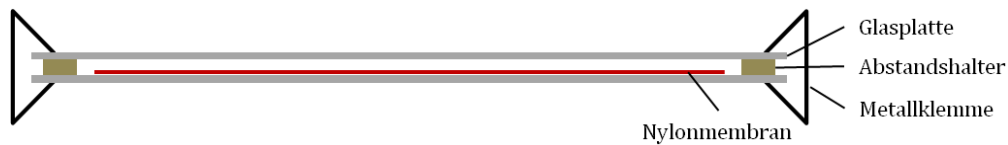


Abb. 2.9: Hybridisierungssandwich (Fladung & Ahuja 1995)

In diesem Aufbau wurde die Nylonmembran zwischen zwei Glasplatten, die durch Abstandshalter einen Freiraum boten, mit der Hybridisierungssonde inkubiert. Die Metallklammern verhinderten das Verrutschen der Glasplatten.

Chemilumineszenz

Bevor die Chemilumineszenzreaktion beginnen konnte, war es notwendig, die Membran in mehreren Waschschrritten vorzubereiten. Die hierfür benötigten Puffer und Lösungen sind in Tab. 2.15 aufgeführt. Alle Waschungen wurden in sauberen Plastikschaalen auf einem Taumelschüttler oder im schwenkenden Wasserbad durchgeführt. Die Membran wurde stets vollständig mit Flüssigkeit benetzt.

Tab. 2.15: Benötigte Puffer und Lösungen

Maleinsäurepuffer (4× konzentriert, 1 L)	Maleinsäurepuffer (1× konzentriert, 1 L)	DIG-Wash Buffer, 1 L
46,40 g Maleinsäure 35,08 g NaCl 30,00 g NaOH ad. 1 L H ₂ O, deionisiert Der pH-Wert 7,5 wurde mit NaOH oder HCl eingestellt.	250 mL Maleinsäurepuffer, 4× konzentriert 750 mL H ₂ O, deionisiert	997 mL Maleinsäurepuffer, 1× konzentriert 3 mL Tween 20
Blocking Solution (10%) für 100 mL	Blocking-Puffer für 400 mL	
10 g Blocking Reagent ad. 0,1 L 1× Maleinsäurepuffer	40 mL Blocking Solution (10%) 360 mL 1× Maleinsäurepuffer	
MgCl₂ (1 M, 100 mL)	NaCl (5 M, 1 L)	Tris (1 M, pH 7,5/8,0/9,5, 1 L)
20,33 g MgCl ₂ ad. 0,1 L H ₂ O, deionisiert	292 g NaCl ad. 1 L H ₂ O, deionisiert	121,1 g Tris 800 mL H ₂ O, deionisiert Der pH-Wert wurde mit konzentrierter Salzsäure auf pH 7,5, 8,0 oder 9,5 eingestellt.
Detection Buffer (500 mL)	SSC (20× konzentriert, pH 7,0, 1 L)	SDS (10%, pH 7,2, 100 mL)
50 mL Tris, 1 M (pH 9,5) 10 mL NaCl, 5 M 25 mL MgCl ₂ , 1 M ad. 0,5 L H ₂ O, deionisiert	175,3 g NaCl 88,2 g Na-Citrat ad. 1 L H ₂ O, deionisiert Der pH-Wert wurde mit NaOH oder HCl auf pH 7,0 eingestellt.	10 g SDS 80 mL H ₂ O, deionisiert ad. 0,1 L H ₂ O, deionisiert Mit konzentrierter Salzsäure wurde der pH-Wert auf 7,2 eingestellt.

Tab. 2.15: Benötigte Puffer und Lösungen (Fortsetzung)

2× SSC / 0,1% SDS (1 L)		0,5× SSC / 0,1% SDS (1 L)		0,1× SSC / 0,1% SDS (1 L)	
100 mL	20× SSC	25 mL	20× SSC	5 mL	20× SSC
10 mL	10% SDS	10 mL	10% SDS	10 mL	10% SDS
890 mL	H ₂ O, deionisiert	965 mL	H ₂ O, deionisiert	985 mL	H ₂ O, deionisiert

Die Membran wurde zunächst zweimal für 10 min mit 2× SSC/0,1% SDS bei Raumtemperatur gewaschen, um ungebundene Sondenmoleküle abzuwaschen. Anschließend folgte eine Waschung für 10 min mit 0,5× SSC/0,1% SDS bei 65 °C, um Fehlpaarungen zu entfernen, und eine hoch stringente Waschung für 15 min mit 0,1× SSC/0,1% SDS bei 65 °C, bei der nur korrekt gepaarte Doppelstränge erhalten bleiben.

Zum Äquilibrieren wurde die Membran für 5 min mit 1× Maleinsäurepuffer bei Raumtemperatur gespült. Anschließend wurde sie für 45 min in *Blocking*-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Inkubation für 30 min mit Antikörper-Lösung. Diese Antikörperlösung bestand aus 15 µL Anti-Digoxigenin-AP („FAB-Fragments“, Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) und 150 mL *Blocking*-Puffer, also einer 1:10.000-Verdünnung. Die Stammlösung der FAB-Fragments wurde zuvor für 5 min zentrifugiert; nur der Überstand wurde für die Antikörperlösung verwendet. Die angesetzte Antikörperlösung wurde für mindestens 15 min gerührt. Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal für 15 min mit DIG-Waschpuffer bei Raumtemperatur gewaschen, anschließend für 5 min in *Detection*-Puffer äquilibriert.

Die Membran wurde in eine Kunststoffolie überführt und mit 1,01 mL CSPD-Substratlösung benetzt, die aus 1 mL *Detection*-Puffer und 10 µL CSPD (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) bestand und auf der Membran flächig verteilt wurde. Die Kunststoffolie wurde luftdicht verschweißt, in eine Filmkassette überführt und hierin für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Kassette für 15 min in einem 37 °C Wärmeschrank inkubiert. Danach wurden in der Dunkelkammer zwei bis vier Chemolumineszenzfilme („Lumi-Film Chemoluminescent Detection Film“, Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) auf die Oberseite der Membran aufgelegt und für die Belichtung inkubiert. Die Inkubationszeit variierte zwischen vier Stunden und drei Tagen.

Filmentwicklung und Auswertung

Für die Filmentwicklung wurden die in Tab. 2.16 aufgeführten Lösungen benötigt. In der Dunkelkammer wurden die Chemilumineszenzfilme der Filmkassette entnommen, in Halterungen eingespannt und dann nachfolgend in die Entwicklungslösungen vollständig eingetaucht: 5 min in Entwickler, 1 min in Essigsäure und 10 min in Fixierer. Anschließend wurden die Filme gründlich mit Leitungswasser abgespült und im Ofen bei 60 °C getrocknet. Anhand von klar zu differenzierenden Banden wurde die Kopienzahl des Transgens ermittelt, wobei eine distinkte Bande einer Kopie entsprach. Die Membran wurde bei -20 °C eingelagert.

Tab. 2.16: Entwicklungslösungen

Das Entwicklerkonzentrat G150 und das Fixiererkonzentrat G354 wurden von der Fa. Agfa (Dübendorf, Schweiz) hergestellt.

Entwickler		Essigsäure		Fixierer	
1,25 L	Entwickler-Konzentrat	0,34 L	Essigsäure, 100%	1,50 L	Fixierer-Konzentrat
6,25 L	H ₂ O, deionisiert	8,16 L	H ₂ O, deionisiert	6,00 L	H ₂ O, deionisiert
7,50 L	Gesamt	8,50 L	Gesamt	7,50 L	Gesamt

2.10.5 „Stripping“

Um die mit einer Sonde hybridisierte DNA einer Nylonmembran mit einer anderen Sonde zu hybridisieren, war es notwendig die Membran einem „Stripping“ zu unterziehen. Hierbei wurde die erste Sonde abgelöst, sodass anschließend ab dem Schritt „Prähybridisierung“ (siehe Abschnitt 2.10.4 Southern Blot/Prähybridisierung) fortgefahren werden konnte. Zum „Stripping“ wurde die Membran 1 min in deionisiertem Wasser bei Raumtemperatur gespült. Anschließend wurde die Membran zweimal für 15 min bei 37 °C in 0,2 M NaOH/0,1% SDS gewaschen. Um eine gute Benetzung zu gewähren, wurde die Membran im Wasserbad mit eingeschalteter Schwenkbewegung inkubiert. Nach einer Äquilibrierung für 5 min bei Raumtemperatur in 2× SSC war die Membran bereit für die weitere Bearbeitung. Falls die Membran nicht direkt anschließend weiter bearbeitet wurde, wurde sie mit 2× SSC benetzt und luftdicht in Kunststoffolie eingeschweißt.

2.10.6 Synthese der Sonden für Southern Blots


Die Sonden für die Southern Blots wurden mit dem PCR DIG Probe Synthesis Kit der Fa. Roche Diagnostics (Mannheim) synthetisiert und die Anleitung des Herstellers befolgt (Tab. 2.17-2.18). Die verwendeten Primer sind in Tab. 2.19 aufgeführt.

Tab. 2.17: Reaktionsmix zur Sondensynthese

Bestandteil	Stockkonzentration	PCR-Konzentration	Volumen [µL]
PCR-Puffermix	10×	1×	5,00
dNTP-Mix	2 mM	0,2 mM	5,00
Forward-Primer	10 µM	0,4 µM	2,00
Reverse-Primer	10 µM	0,4 µM	2,00
DNA-Polymerase	3,5 U/µL	1,8 U	0,80
DNA	100 ng/µL	200 ng	2,00
H ₂ O			33,20
Gesamtvolumen			50,00

Tab. 2.18: PCR-Thermoprofil zur Sondensynthese

Die *Annealing*-Temperatur T_A variierte je nach eingesetztem Primer.

Temperatur [°C]	Zeit [min]	Vorgang	Zyklen
95,0	2:00	Initiale Denaturierung	
95,0	0:30	Denaturierung	
T _A	0:30	Primer- <i>Annealing</i>	
72,0	0:40	Elongation	
72,0	7:00	Abschluss-Elongation	
4,0	∞	Lagerung	

Tab. 2.19: Primerkombinationen für die Sondensynthese

Primerkombination zur Sondensynthese		Bindesequenz der Sonde und Sondenlänge
Forward-Primer	Reverse-Primer	
#317 TTG AAC AAG ATG GAT TGC ACG	#318 AAG AAG GCG ATA GAA GGC GA	Kanamycinresistenz <i>NPTII</i> , 780 bp
#337 AAA GCC TGA ACT CAC CGC GA	#338 TCG GTT TCC ACT ATC GGC GA	Hygromycinresistenz <i>HPT</i> , 988 bp
#1360 ACC TCC TCG GAT TCC ATT GC	#438 AAA TAG CGA TCA TAG CGT TCA AGT	<i>FUL</i> (in A137), 549 bp
#1641 GAA TGC AAC AAG CAG ACA AGT G	#1644 GCG TCT CTA CTT CAG AAC TTG G	<i>SOCI</i> (in A122), 571 bp

Elektrophorese

50 µL PCR-Produkt wurden mit 10 µL 6× Orange G-Ladepuffer versetzt, in kleinere Volumen aufgeteilt und auf ein 1,5%-Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für 1:20 h bei 115 V laufen gelassen und anschließend unter UV-Bestrahlung fotografiert.

Gelelution

Die Banden mit dem gewünschten PCR-Produkt wurden mit Kunststoff-Ausstechhilfen („X-Tracta Generation II“, Fa. Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf) unter UV-Belichtung aus dem Agarosegel herausgelöst und mit Hilfe des Kits „Agarose Gelextract Mini Kit“ (Fa. 5Prime, Hilden) eluiert. Hierfür wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen:

Die Gelfragmente wurden in 1,5 mL-Reaktionsgefäßen mit 300 µL PS-Puffer vermischt und bis zur Auflösung der Gelstruktur bei 55 °C mit ständiger Schüttelbewegung inkubiert. Eine Aufreinigungssäule des Kits wurde auf ein Sammelgefäß gesteckt und mit 500 µL BL-Puffer äquilibriert. Der Puffer wurde durch 1 min Zentrifugation bei 16.060 G abgeschieden. Nach Beendigung der Inkubation wurde die Probe auf eine Aufreinigungssäule gegeben und für 1 min bei 16.060 G zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. 700 µL PW-Puffer wurden auf die Aufreinigungssäule gegeben und diese erneut für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurden 500 µL PW-Puffer auf die Säule aufgetragen und für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule noch einmal für 2 min zentrifugiert, um alle Pufferrückstände zu entfernen. Der Durchfluss wurde ebenfalls verworfen. Die Deckel der Säulen wurden geöffnet, um für einige Minuten zu trocknen. Zur Elution der DNA aus der Aufreinigungssäule wurden 50 µL PEB-Puffer (entspricht 10 mM Tris-HCl, pH 8,5) hinzugegeben, für 2 min inkubiert und dann für 1 min zentrifugiert. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde der Durchfluss noch einmal auf die Säule pipettiert, inkubiert und erneut zentrifugiert.

Quantifizierung und Sequenzierung

Da die spektralphotometrische Konzentrationsmessung der Sonde aufgrund der DIG-Markierung nicht möglich war, wurde die Sonde im Agarosegel quantifiziert. Dafür wurde ein 1,5% TBE-Agarosegel hergestellt, wie in Abschnitt 2.10.3 (Gelelektrophorese) beschrieben. Es wurde mit 10 µL Probenvolumen aus 5 µL Sonde und 5 µL Orange G-Ladepuffer beladen. Anhand des ebenfalls auf dem Agarosegel aufgetragenen SmartLadder (Abb. 2.7) wurden die Banden der Sonden nach ihrem Erscheinungsbild

quantifiziert. Um gebrauchsfertige Sonden-Aliquots bereitzustellen, wurden 50 ng Sonde in 1 mL Prähybridisierungslösung vermischt und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

Zur Absicherung der richtigen Sondensequenz wurden einige Chargen der Sonden sequenziert. Dafür wurde das PCR-Produkt aus der Sondensynthese mit einer Lithiumchlorid-Fällung aufgereinigt: 40 µL Probenvolumen wurden mit 8 µL LiCl (4 M) und 260 µL absolutem Ethanol vermischt und für mindestens 1 h bei -70 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 20 min bei 16.060 G zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um die gesammelte DNA aufzureinigen, wurden 260 µL 70% Ethanol hinzugefügt und die Zentrifugation wiederholt. Die DNA wurde bei 55 °C getrocknet und anschließend in 20 µL Wasser aufgenommen. Ein Sequenzierungsansatz wurde dann aus 2,5 µL DNA, 1 µL Primer (10 µM) und 3,5 µL Wasser zusammengestellt und durch die Fa. StarSEQ (Mainz) sequenziert. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit der Sequenz der Transformationskonstrukte abgeglichen.

2.10.7 TAIL-PCR zur Identifikation des Integrationsortes der T-DNA

Während der Transformation wird die T-DNA willkürlich in das Kerngenom der Zellen integriert. Hierbei können Sequenzen durch den Integrationsort in ihrer Funktion beeinträchtigt sein, z. B. Proteinkodierende Genregionen oder Promoter, was als Positionseffekt bezeichnet wird. Dies kann auch einen phänotypischen Effekt auslösen. Um den Integrationsort zu identifizieren, wurde von phänotypisch auffälligen Sublinien eine *thermal asymmetric interlaced PCR* (TAIL-PCR) durchgeführt (Tab. 2.20). Dafür wurde ein bewährtes Protokoll verwendet, das auf Liu *et al.* (1995) und Fladung & Polak (2012) basiert.

Tab. 2.20: Reaktionsmix für die TAIL-PCR

In Reaktionen, bei denen der *GC-Enhancer* (Fa. Invitrogen, Carlsbad, USA) oder DMSO nicht verwendet wurden, wurde das Volumen durch ein entsprechendes Volumen an Wasser ersetzt. Die DNA-Polymerase stammte von der Fa. DNA Cloning Service (Hamburg), Fa. Invitrogen oder New England Biolabs (Frankfurt am Main).

Bestandteil	Stockkonzentration	PCR-Konzentration	Volumen [µL]
PCR-Puffer BD	10×	1×	2,5
MgCl ₂	50 mM	1,8 mM	0,9
dNTP-Mix	10 mM	0,2 mM	0,5
Forward-Primer	10 µM	0,4 µM	1,0
Reverse-Primer	10 µM	0,4 µM	1,0
GC-Enhancer oder DMSO	100%	2%	0,5
DNA-Polymerase	5 U/µL	0,5 U	0,1
DNA	100 ng/µL	100 ng	2,0
H ₂ O			16,5
Gesamtvolumen			25,0

Grundlegendes Prinzip war die Durchführung von *nested* PCRs mit einer Kombination aus spezifischen und willkürlich degenerierten Primern (Tab. 2.21), von denen die degenerierten Primer an unbekannter Stelle im Pflanzengenom binden. Die einzelnen PCRs wurden mit I, II und III durchnummeriert. Die spezifischen Primer (Tab. 2.21) wurden so gestaltet, dass sie eine hohe Schmelztemperatur zwischen 58 und 63 °C aufwiesen. Die degenerierten Primer schmolzen bereits bei einer Temperatur von 44-48 °C.

Tab. 2.21: Degenerierte und spezifische Primer für die TAIL-PCR

Degenerierte Primer		
Nr.	Sequenz	Status
#521	NTC GAS TWT SGW GTT	64-fach degeneriert
#522	NGT CGA SWG ANA WGA A	128-fach degeneriert
#523	WGT GNA GWA NCA NAG A	256-fach degeneriert
Spezifische Primer		
Nr.	Sequenz	Verwendung für
#1946	GGT TCA CGT AGT GGG CCA TC	TAIL-PCR I, N 94 (A122)
#1947	ACA CTC AAC CCT ATC TCG GG	TAIL-PCR II, N 94 (A122)
#1944	GTG AAG GGC AAT CAG CTG TTG	TAIL-PCR III, N 94 (A122)
#1614	GGA TTG AGA GTG AAT ATG AGA C	TAIL-PCR I, N 94 (A137)
#1499	TTG CTA GCT GAT AGT GAC CTT	TAIL-PCR II, N 94 (A137)
#604	TTC AAC GTT GCG GTT CTG TCA	TAIL-PCR III, N 94 (A137)
#1910	AGG AGA AAG CTC TAG CTG CAG	TAIL-PCR I, N 407 (A141)
#1908	AGA TAT GCG AGA CGC CTA TG	TAIL-PCR II, N 407 (A141)
#1907	TTA CTG ATT GTC CTC GAC AGG	TAIL-PCR III, N 407 (A141)
#1911	TTC CCG CTT CAG TGA CAA CG	TAIL-PCR I, N 407 (A137)
#564	CCG GAC AGG TCG GTC TTG ACA AA	TAIL-PCR II, N407 (A137)
#566	AAT AGC CTC TCC ACC CAA GC	TAIL-PCR III, N 407 (A137)
#1923	GTT CGA TCT TGC TGC GTT CGG	TAIL-PCR I, N 373, N 371, N 399, N 369, N 361, N 375
#1922	CTG TTG CCG GTC TTG CGA TG	TAIL-PCR II, N 373, N 371, N 399, N 369, N 361, N 375
#1921	GCG CGG TGT CAT CTA TGT TAC TAG	TAIL-PCR III, N 373, N 371, N 399, N 369, N 361, N 375
#1984	TAA GGA TCC TCT AGA GTC CGC	TAIL-PCR I, N 369
#1983	AGG GTT CTT ATA GGG TTT CGC TC	TAIL-PCR II, N 369
#1982	CAA AAT CCA GTG ACC TGC AGG	TAIL-PCR III, N 369
#1755	AAA CCT TTG TTC CTG AAG AGA A	TAIL-PCR I, N 405 (A185)
#1754	ACT CAG CCC TCG TTA ATG GT	TAIL-PCR II, N 405 (A185)
#1753	GTA CCT TGA TCA GTT TGT CTG	TAIL-PCR III, N 405 (A185)
#2015	CCA GAA CAG CCA CTC AAA CTA C	TAIL-PCR I, N 405 (A194)
#2016	GAG GGA GAT GTA TCC ACA AAC AC	TAIL-PCR II, N 405 (A194)
#2017	CTT TGC CTG GTT CTG GAA CC	TAIL-PCR III, N 405 (A194)

Die degenerierten Primer wurden stets in der Reihenfolge 64-fach, 128-fach und 265-fach degeneriert eingesetzt. Für die TAIL-PCR I wurde standardmäßig 100 ng DNA eingesetzt. Für die TAIL-PCR II wurde als Template 1 µL einer 1:50-Verdünnung von der TAIL-PCR I aus 1 µL PCR-Produkt und 49 µL H₂O verwendet. Für die TAIL-PCR III diente 1 µL des PCR-Produkts von TAIL-PCR II als Template. Die PCRs wurden nach dem Thermoprofil aus Tab. 2.22 durchgeführt.

Die PCR-Produkte wurden mit 2,5 µL 6× Orange G-Ladepuffer versetzt und vollständig auf ein 1,3% bis 1,5% Agarose-TBE-Elektrophoreseigel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 120 V durchgeführt. Prominente Banden wurden aus dem Agarosegel ausgestochen und wie im Abschnitt 2.10.6 (Synthese der Sonden für Southern Blots) beschrieben eluiert. Um für die für die Sequenzierung erforderliche DNA-Konzentration zu erreichen, wurde das Volumen des Eluats im Vakuum-Konzentrator reduziert. Durch eine spektralphotometrische Messung im NanoDrop wurde die Konzentration gemessen und das erforderliche DNA-Volumen für die Sequenzierung berechnet.

Tab. 2.22: Thermoprofil für die TAIL-PCR

Die *Annealing*-Temperatur T_A variierte je nach eingesetztem, spezifischem Primer. *) Temperatur auf 72 °C ansteigend mit 0,261 °C/s.

TAIL I-PCR			TAIL II-PCR			TAIL III-PCR		
Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
93	1:00	1	94	0:10	12	94	0:15	20
95	1:00		T_A	1:00		44	1:00	
94	0:30	72	2:30	72		2:30		
T_A	1:00	5	94	0:10		72	5:00	1
72	2:30	T_A	1:00	4		∞		
94	0:30	1	72	2:30		1		
25	3:00		94	0:10			72	5:00
72*	2:30		44	1:00			72	2:30
94	0:10	15	72	2:30			4	∞
T_A	1:00		72	5:00				
72	2:30		4	∞				
94	0:10							
T_A	1:00							
72	2:30							
94	0:10							
44	1:00							
72	2:30							
72	5:00		1					
4	∞							

Der Reaktionsansatz zur Sequenzierung bestand aus maximal 6 μ L DNA und 1 μ L Primer (10 μ M). Wenn aufgrund hoher DNA-Konzentration das Volumen reduziert wurde, wurde ein entsprechendes Volumen Wasser eingesetzt, um 7 μ L zu erreichen. Als Primer wurden die jeweiligen PCR-Primer ausgewählt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der Plasmidsequenz verglichen, um die *Border*-Sequenz zu identifizieren. Der Sequenzbereich außerhalb der *Border* der T-DNA stammt von der genomischen Sequenz der transformierten Pflanze. Diese Sequenz wurde mit einer *BLAST*-Analyse in der Datenbanksequenz von *P. trichocarpa* auf <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html> sowie von *P. × canescens* auf <http://aspenb.uga.edu/spta717/Blast/> gesucht. Wenn kein Suchergebnis erzielt werden konnte, wurde eine *BLAST*-Analyse auf <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> durchgeführt, die nicht auf eine Art beschränkt war und auch Sequenzen von Vektoren enthielt.

2.11 Expressionsanalysen

2.11.1 Denaturierende Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der RNA-Qualität wurden denaturierende Gelelektrophoresen durchgeführt. Die folgende Methode wurde grundsätzlich Sambrook *et al.* (1989) entnommen und stellenweise modifiziert. Um aus dem verwendeten Wasser RNasen zu entfernen, wurde Diethylpyrocarbonat (DEPC) verwendet. 1 mL DEPC-Lösung wurde zu 1 L deionisiertem Wasser hinzugegeben und über Nacht gerührt. Beim anschließenden Autoklavieren zersetzte sich DEPC zu Ethanol und Kohlenstoffdioxid. Alle Geräte für den

Elektrophoreseaufbau wurden mit Natriumhypochlorid gereinigt und mit DEPC-Wasser gespült, um RNasen zu beseitigen. Glasgefäße, Spatel und Magnetrührstäbe wurden für 6 h bei 180 °C gebacken.

Für die Herstellung des 5× Laufpuffer wurde vorab 50 mM Natriumacetatlösung hergestellt. 1 L Natriumacetatlösung enthielt 4,10 g Natriumacetat. Von dieser Lösung wurden 800 mL versetzt mit 20,6 g 3-(*N*-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS). Unter Zugabe von 1 M NaOH wurde der pH-Wert der Lösung auf 7,0 eingestellt. Anschließend wurden 10 mL 0,5 M EDTA-Lösung (Fa. AppliChem, Darmstadt) hinzugefügt sowie DEPC-Wasser bis zu einem Endvolumen von 1 L. Der 5× Laufpuffer wurde dunkel und bei Raumtemperatur gelagert.

Zur Herstellung des zweiprozentigen Elektrophoresegels wurden 3,6 g Agarose in 180 mL DEPC-Wasser gegeben und bis zur vollständigen Lösung aufgekocht. Bei Erreichen von Handwärme wurden 60 mL 5× Laufpuffer und 49,14 mL Formaldehyd (37%) hinzugegeben. Mit DEPC-Wasser wurde das Volumen, unter Berücksichtigung der Verdunstung beim Aufkochen der Agaroselösung, auf 300 mL aufgefüllt. Die Lösung wurde im Anschluss in den Gelträger gegossen. Nach der Aushärtung konnte der Gelträger in die Elektrophoresekammer mit 1× Laufpuffer ($\frac{1}{5}$ -Verdünnung des 5× Laufpuffers mit DEPC-Wasser) überführt werden.

Ein Probenvolumen von 5 µL wurde mit 15 µL „Roti-Load RNA“ (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) versetzt. Vor dem Probenauftrag auf das Agarosegel wurden die Proben für 15 min bei 65 °C denaturiert und anschließend kurz abzentrifugiert. Der Ladepuffer „Roti-Load RNA“ setzt sich nach den Angaben des Herstellers folgendermaßen zusammen: Formamid 63,7%, MOPS 12,7 mM, Na-Acetat 5,1 mM, EDTA 0,6 mM, Formaldehyd 8,2%, Bromphenolblau 0,03%, Ethidiumbromid 0,006%. Durch das enthaltene Ethidiumbromid entfiel das Färben des Agarosegels nach der Elektrophorese.

Als Fragmentlängenmarker (Abb. 2.10) wurden 2 µL „ssRNA Ladder“ (0,5 µg/µL, Fa. New England Biolabs, Frankfurt am Main) mit 10 µL Roti-Load RNA Ladepuffer vermischt, für 2 min bei 92 °C denaturiert und nach Abkühlung auf Eis auf das Agarosegel aufgetragen.

Vor dem eigentlichen Elektrophoreselauf wurde das Gel 5 min bei 65 V (5 V pro cm) inkubiert. Dann wurden die Proben aufgetragen und das Agarosegel bei 52 V (4 V pro cm) laufen gelassen. Nach gewünschtem Auftrennungsgrad wurde das Agarosegel unter UV-Bestrahlung fotografiert.

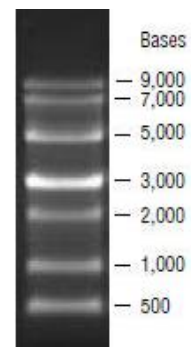


Abb. 2.10: Bandengrößen des Fragmentlängenmarkers ssRNA Ladder
(Fa. New England Biolabs, Frankfurt am Main)

2.11.2 RNA-Qualitätskontrolle am Bioanalyzer

Ein möglichst unbeeinträchtigt RNA-Template war erforderlich für reproduzierbare Ergebnisse in der qRT-PCR. Zum Überprüfen der RNA-Integrität wurde die RNA im Bioanalyzer „Agilent 2100“ (Fa. Agilent Technologies, Waldbronn) untersucht. Dafür wurde das Kit „Agilent RNA 6000 Nano“ (Fa. Agilent Technologies, Waldbronn) mit dem vom Hersteller vorgegebenen Protokoll verwendet.

Die extrahierte und DNase-behandelte RNA wurde je nach vorliegender Konzentration im Verhältnis 1:3 oder 1:4 mit RNase-freiem Wasser verdünnt, für 2 min bei 70 °C denaturiert und dann analysiert. Als Größenmarker wurde der RNA LADDER des Kits, der ebenfalls denaturiert und bei -70 °C gelagert wurde,

eingesetzt. RNA-Proben mit einem RIN-Wert von 7,0 oder darüber wurden für die cDNA-Synthesen und anschließende Expressionsanalysen verwendet (Udvardi *et al.* 2008).

2.11.3 Reverse Transkription

Aus der isolierten RNA wurde per Reverser Transkription cDNA synthetisiert. Hierfür wurden die zwei Kits „SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit“ (Fa. Invitrogen, Carlsbad, USA) und „InnuSCRIPT Reverse Transcriptase“ (Fa. Analytik Jena, Jena) verwendet.

2.11.3.1 SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit

Zur Reversen Transkription wurden Reaktionsansätze hergestellt aus 4 µL 5× VILO Reaktionsmix, 2 µL 10× SuperScript Enzymmix sowie einem variierenden Volumen Gesamt-RNA. Der Reaktionsmix enthielt neben dem Reaktionspuffer die Random-Primer, MgCl₂ und dNTPs. Bis zu 2.500 ng RNA wurden für die Synthese eingesetzt. Mit DEPC-behandeltem Wasser wurde das Volumen auf 20 µL aufgefüllt. Die Reaktionsansätze wurden nacheinander für 10 min bei 25 °C, für 60 min bei 42 °C und für 5 min bei 85 °C inkubiert. Per spektralphotometrischer Messung im NanoDrop wurde die cDNA-Konzentration bestimmt.

2.11.3.2 InnuSCRIPT Reverse Transcriptase

Zunächst wurde ein Reaktionsansatz mit 3 µL Random-Primer (100 ng/µL), ca. 2500 ng RNA und dem Differenzvolumen Wasser, um 14,2 µL Gesamtvolumen zu erreichen, zusammengestellt. Dieser wurde für 5 min bei 65 °C und für 10 min bei 22 °C inkubiert. Anschließend wurde der erste Reaktionsansatz mit 2,0 µL 10× RT-Puffer, 0,8 µL dNTPs (25 mM), 2,0 µL DTT (100 mM) und 1,0 µL Reverse Transkriptase (25 U/µL) vermischt. Dieser zweite Reaktionsansatz wurde folgendermaßen inkubiert: 10 min bei 25 °C, 1 h bei 50 °C, 15 min bei 70 °C. Anschließend wurde die synthetisierte cDNA bei 4 °C gekühlt und per spektralphotometrischer Messung im NanoDrop quantifiziert.

2.11.4 Expressionsanalysen mittels semiquantitativer RT-PCR

Die Überexpression von *AtSOC1* und *SaFUL* wurden per semiquantitativer RT-PCR nachgewiesen, da diese Gene endogen nicht vorhanden waren. Dafür wurden PCRs mit 200 ng cDNA, die wie zuvor beschrieben synthetisiert wurde, durchgeführt. Das PCR-Protokoll entspricht der in Abschnitt 2.10.2 (Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis der Zielgene) dargelegten Methodik. Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarose-Elektrophoreseigel aufgetrennt wie dies in Abschnitt 2.10.3 (Gelelektrophorese) beschrieben ist.


2.11.5 Expressionsanalysen mittels qRT-PCR

Die Planung und Durchführung der qRT-PCR-Experimente waren gebunden an die anerkannten MIQE-Richtlinien zur Sicherung von wissenschaftlichen Mindeststandards (Bustin *et al.* 2009). Die qRT-PCRs wurden im Gerät Mx3000P der Fa. Stratagene (Santa Clara, USA) durchgeführt und hierbei die zugehörige Software MxPro - Mx3000P v4.10 (Fa. Stratagene, Santa Clara, USA) verwendet. Das Gerät erforderte die Verwendung eines PCR-Kits inklusive ROX, einem Farbstoff, der das Hintergrundsignal nivellierte. Unter diesen Voraussetzungen wurde das Kit „Fast Plus EvaGreen qPCR Master Mix - Low Rox“ der Fa. Biotium (Hayward, USA) verwendet. Das in Tab. 2.23 aufgeführte Temperaturprofil wurde vom Hersteller zur

Benutzung mit dem Kit empfohlen. Das Primerdesign wurde unter Berücksichtigung der Richtlinien von Udvardi *et al.* (2008) durchgeführt und die Auswahl der Primer mit Hilfe der Online-Software „QuantPrime“ (<http://www.quantprime.de>, Arvidsson *et al.* 2008) erstellt, die auf die Datenbanksequenz von *P. trichocarpa* zurückgriff. Wenn nötig wurden die Primer anhand der Datenbanksequenz von *P. × canescens* auf <http://aspndb.uga.edu> an den Versuchsklon P1 angepasst. Die eingesetzten Primer sind in Tab. 2.24 aufgeführt.

Tab. 2.23: Temperaturprofil der qRT-PCR

Das Temperaturprofil setzte sich aus einer wiederholenden Zwei-Schritt-Kombination (Denaturierung und Annealing mit Elongation) und einer abschließenden Schmelzkurve zusammen.

Temperatur [°C]	Zeit [min]	Vorgang	Zyklen
95,0	2:30	Initiale Denaturierung und Enzym-Aktivierung	
95,0	0:10	Denaturierung	
60,0	0:30	Primer-Annealing und Elongation	
95,0	0:10	Denaturierung	
60,0 ansteigend nach 95,0		Schmelzkurve	
4,0	∞	Lagerung	

Tab. 2.24: Primer für die qRT-PCR

Primer	Sequenz	Anwendung
#1561	ATA TCA CCA CAT CCA CCT GCT TG	Expressionsanalyse in N 369 und N 399
#1853	TCA CTT TGA TCC ATG GAG ATA TCG	Expressionsanalyse in N 369 und N 399
#2078	GCT CGA ACG GAC TTG GGA ACT TTG	Expressionsanalyse in N 373
#2079	TTC ACT CCG THG CTG CAT CTC CAC	Expressionsanalyse in N 373

2.11.6 Ermittlung der Referenzgene

In der Literatur beschriebene oder aus eigener *in silico*-Analyse auf Grundlage von *P. trichocarpa* oder *P. × canescens* ausgewählte Referenzgene wurden auf ihre Nutzbarkeit für die Pappel getestet. Hierzu wurden die Gene *PtPP2*, *PtTUA2*, *PcUBQ*, *PtUBQ*, *PtACT2* und *PtACT5* verwendet. Das Gen *ACT2* (Potri.001G309500) wurde von Pettengill *et al.* (2012) als eines der stabilsten Haushaltsgene in *P. × canescens* identifiziert und daher zur Verwendung in qRT-PCR-Experimenten vorgeschlagen. Weitere positive Erfahrungen wurden bei der Arbeit mit Pappeln mit dem Ubiquitin von *P. × canescens* *PcUBQ* (M. Muhr, Universität Göttingen, pers. Mitteilung) und einem Gen der Actin-Genfamilie aus *P. trichocarpa*, *PtACT5*, gemacht (M. Riefler, Freie Universität Berlin, pers. Mitteilung). Die drei übrigen Haushaltsgene wurden bereits am Thünen-Institut für Forstgenetik verwendet. Für die PCRs wurden die in Tab. 2.25 aufgelisteten Primer eingesetzt.

Tab. 2.25: Primer für die Referenzgene der qRT-PCR

Bei den Genbezeichnungen *PtACT5a*, *PtACT5b* und *PtACT5c* handelte es sich um drei Primerkombinationen, die das selbe Gen amplifizierten.

Gen	Primer	Sequenz
Proteinphosphatase von <i>P. trichocarpa</i> <i>PtPP2</i> (Potri.010G127500)	#1409	TAA ACT GCT GCC AGT GGT CGT C
	#1410	ACG GAT TGT CTT CTC TGC AAC AG
Tubulin von <i>P. trichocarpa</i> <i>PtTUA2</i> (Potri.003G220300)	#1553	GGA GTG ATG CCT AGT GAC GCT
	#1554	TTG AAT GCA TCG TGT GCA AC
Ubiquitin von <i>P. × canescens</i> <i>PcUBQ</i> (Ortholog zu Potri.001G418500)	#1547	GTC CAC CCT CCA TTT GGT CC
	#1548	GGT CTT TCC TGT GAG CGT CT
Ubiquitin von <i>P. trichocarpa</i> <i>PtUBQ</i> (Potri.001G418500)	#1551	GTT GAT TTT TGC TGG GAA GC
	#1552	GAT CTT GGC CTT CAC GTT GT
Actin-Gen von <i>P. trichocarpa</i> <i>PtACT2</i> (Potri.001G309500)	#1401	TGG CCG ATG CCG AGG ATA TTC AAC
	#1402	ATC ACC TGC AAA CCC AGC CTT CAC
Actin-Gen von <i>P. trichocarpa</i> <i>PtACT5a</i> (Potri.010G204300)	#1549	CAT TGG TGC TGA GCG ATT CCG TTG C
	#1550	TTT TCA TGC TGC TTG GGG CTA GTG C
Actin-Gen von <i>P. trichocarpa</i> <i>PtACT5b</i> (Potri.010G204300)	#1555	TGT CTG GAT CGG TGG CTC TAT C
	#1556	TGC CTT AGC AAT CCA CAT CTG C
Actin-Gen von <i>P. trichocarpa</i> <i>PtACT5c</i> (Potri.010G204300)	#1555	TGT CTG GAT CGG TGG CTC TAT C
	#1557	TCT GCC TTA GCA ATC CAC ATC TGC

Da zunächst keine Genomsequenzen von den Versuchsklonen Esch5 und P1 vorlagen, wurde überprüft, ob sie in der genomischen DNA der Versuchsklone und zusätzlich in dem sequenzierten Klon Nisqually-1 von *P. trichocarpa* banden (Abb. 2.11). Unter Einsatz der Primer für *PtPP2* und *PtTUA2* wurde in genomischer DNA kein Amplifikat nachgewiesen. Mit den anderen Primern ließ sich ein PCR-Produkt gewinnen. Für die weitere Bearbeitung wurden *PtACT2*, *PcUBQ* und *PtACT5a* ausgewählt.

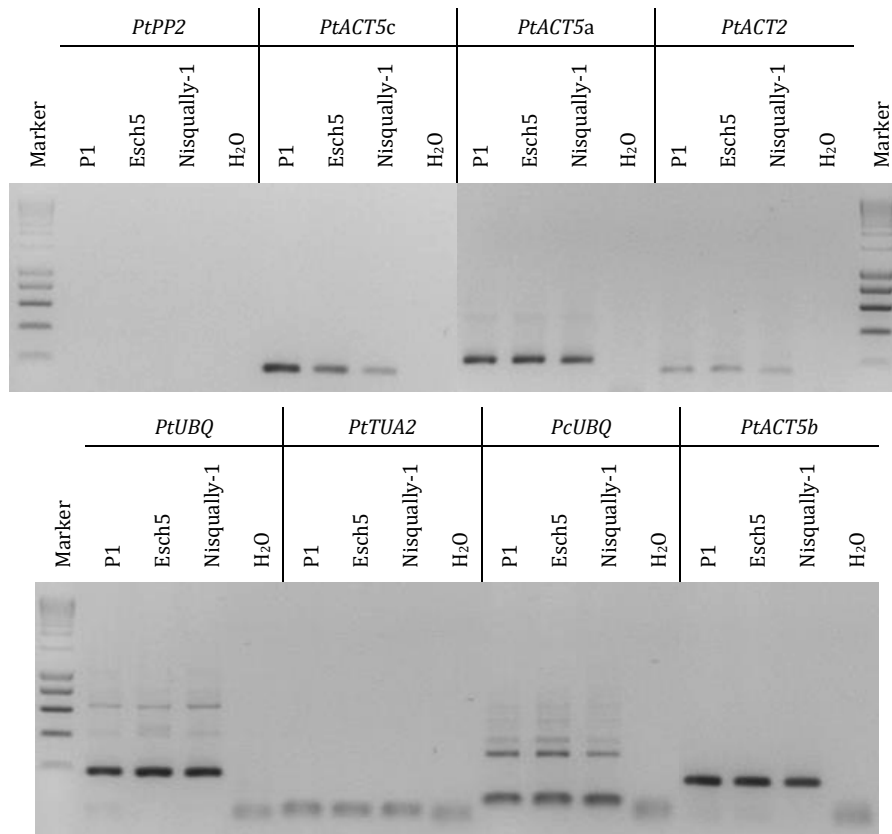


Abb. 2.11: gDNA-Test mit qRT-PCR Referenzprimer

Zur Überprüfung, ob die Referenzprimer ausgewählter Haushaltsgene für die qRT-PCR in der genomischen DNA der drei Pappelklone P1 (*P. × canescens*), Esch5 (*P. tremula × P. tremuloides*) und Nisqually-1 (*P. trichocarpa*) binden, wurde eine PCR mit den jeweiligen Primern, den dazugehörigen *Annealing*-Temperaturen und 38 Amplifikationszyklen durchgeführt. 5 µL der PCR-Produkte wurden auf einem 1,5% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. Als Marker diente der SmartLadder der Fa. Eurogentec. Die Primer von *PtPPP2* und *PtTUA2* banden nicht in den getesteten Klonen, bei allen anderen Proben wurde mindestens ein PCR-Produkt nachgewiesen. Mehrere Produkte wurden bei *PtACT5a*, *PtUBQ* und *PcUBQ* festgestellt, die auf unspezifische Bindungen hindeuteten.

Für die Ermittlung der PCR-Effizienz, die die Eignung von zur Normalisierung geeigneten Hausgenen definiert, wurden unterschiedliche Mengen an cDNA zur Amplifikation eingesetzt. Dazu wurden jeweils 50, 100 und 200 ng cDNA für eine qRT-PCR mit den Primerpaaren #1401 und #1402 (*PtACT2*), #1547 und #1548 (*PcUBQ*) sowie #1549 und #1550 (*PtACT5a*) verwendet. Die cDNA wurde aus RNA produziert, deren RIN 8,0 betrug und am 23.06.2015 aus Kambium von P1 gewonnen wurde. Es wurden drei Duplikate untersucht. Ihr Mittelwert ging in die untenstehenden Berechnungen ein. Die Mittelwerte der Ct-Datenpunkte wurden grafisch aufgetragen gegen die logarithmierten Werte für die Menge der eingesetzten cDNA von 50, 100 und 200 ng (Abb. 2.12). Es wurden lineare Geraden eingezeichnet, deren Steigung *m* zur Berechnung der PCR-Effizienz *E* verwendet wurde (Tab. 2.26):

Geradengleichung $y = m \times x + n$ m: Steigung
n: y-Achsenabschnitt

PCR-Effizienz $E = (-1 / m)^{-1}$ m: Steigung

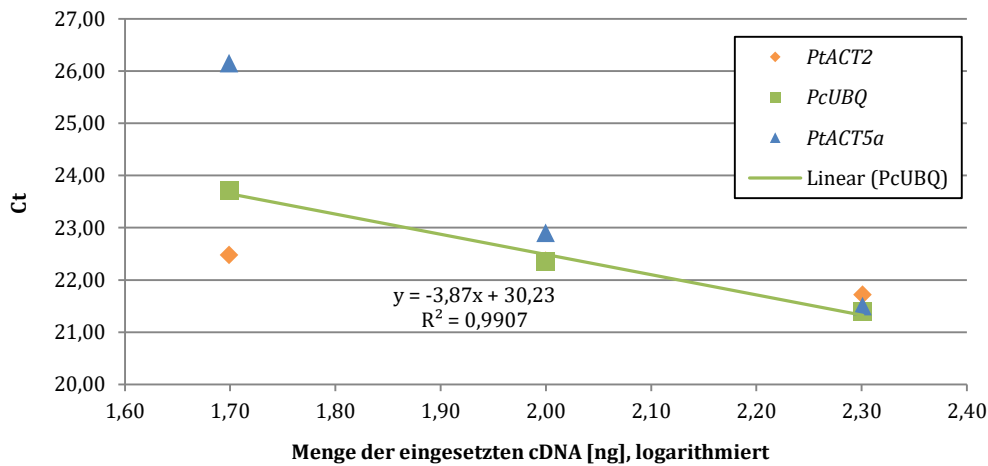


Abb. 2.12: Ermittlung der PCR-Effizienz von verschiedenen Haushaltsgenen zur Normalisierung der qRT-PCR

Eingezeichnet ist die lineare Regressionsgerade von *PcUBQ*, deren Steigung $m = -3,87$ zur Berechnung der PCR-Effizienz verwendet wurde. Das Bestimmtheitsmaß R^2 der Regressionsgerade liegt bei 0,9907.

Tab. 2.26: Berechnung der PCR-Effizienzen der Haushaltsgene *PtACT2*, *PcUBQ* und *PtACT5a*

Zur Normalisierung geeignet war *PcUBQ* mit einer PCR-Effizienz E von 81,3%.

ng cDNA	log(ng cDNA)	<i>PtACT2</i> Ct	<i>PcUBQ</i> Ct	<i>PtACT5a</i> Ct
50	1,70	22,48	23,72	26,15
100	2,00	22,37	22,36	22,90
200	2,30	21,72	21,39	21,50
Steigung der Geraden m:		-1,26	-3,87	-7,72
PCR-Effizienz E [%]:		519,73	81,30	34,73
PCR-Effizienz E (absolut):		5,20	0,81	0,35

Anhand der berechneten PCR-Effizienz von $E = 0,81$ war es sinnvoll, *PcUBQ*, also Ubiquitin aus *P. × canescens*, zur Normalisierung der qRT-PCR-Daten zu verwenden. Die berechnete PCR-Effizienz von *PtACT5a* war zu niedrig. Für *ACT2* wurde kein verlässlicher Wert ermittelt.

2.12 Pappelkultur im Gewächshaus

Ausgewählte Pflanzen wurden aus der Gewebekultur in den Gärtnereibetrieb überführt. Für die Überführung wurden die Pflanzen ihren Behältern entnommen, vom Nährmedium befreit und mit den Wurzeln in gesiebtes Erds substrat gesetzt. Die Angleichung der Luftfeuchtigkeit (100% in den Kulturgefäßen) zur nicht-geregelten Luftfeuchtigkeit im Gewächshaus wurde allmählich vorgenommen: Die frisch überführten Pflanzen wurden abgedeckt, sodass eine hohe Luftfeuchtigkeit gewährleistet war. Durch sukzessives Belüften über mindestens fünf Tage wurden die Pflanzen an die Luftfeuchtigkeit der Umgebung gewöhnt. In den Gewächshäusern war eine Temperaturregelung installiert, die im Sommer über die Dachfenster reguliert wurde, durch die auch der Luftaustausch stattfand. Im Winter wurden die Gewächshäuser frostfrei gehalten.

Als Erds substrat diente Containersubstrat der Fa. Gramoflor (Vechta). Die Nährstoffangaben sind in Tab. 2.27 aufgeführt. Die Pflanzen im Gewächshaus wurden mit dem Düngemittel Plantosan (Fa. Manna, Ammerbuch-Pfäffingen) in der Konzentration 1-3 g/L versorgt, um die Nährstoffzufuhr sicherzustellen.

Im Gewächshaus wurden die Pflanzen mit Leitungswasser gegossen. Dieses Wasser befindet sich mit einer durchschnittlichen Gesamthärte von 12,3 °dH im mittleren Härtebereich (Fa. Hamburger Wasserwerke, pers. Mitteilung, 04.02.2015). Die Pflanzen wurden in Pflanztöpfen mit den Durchmesser 7, 12, 16, 19, 21 und 26 cm kultiviert. Überschüssiges Wasser konnte durch Löcher im Boden abfließen. Das Umtopfen wurde in der ersten Zeit der Kultivierung nach Bedarf, danach immer im Frühjahr durchgeführt. Dabei wurde der Wurzelballen manuell aufgelockert. Auf der Oberfläche der Pflanztöpfe wachsendes Moos wurde entfernt.

Tab. 2.27: Nährstoffgehalt des Containersubstrats (Fa. Gramoflor, Vechta)

Typenbestimmende Bestandteile	
pH-Wert	pH 5,8
Salzgehalt	1,4 g/L
Hochmoortorf [H2-H4 und H4-H8 in Vol. %]	100
Weitere Ausgangsstoffe	Kohlensaurer Kalk, NPK-Dünger
Nebenbestandteile	Fe-Chelat, Netzmittel
Nährstoff-Gehalt	
Stickstoff	170 mg/L
Phosphat	190 mg/L
Kalium	210 mg/L
Magnesium	150 mg/L
Schwefel	120 mg/L

Die Kultivierung der Pappeln im Gewächshaus unterlag vielen Parametern, die auch individuell das Wachstum einzelner Pflanzen beeinflussen konnten. Den größten Einfluss auf das Wachstum der Pappeln hatte wahrscheinlich der Standort im Gewächshaus. Durch andere Pflanzen im selben Beet, aber auch durch die Positionierung des Beets im Gewächshaus, erhielten die Pappeln unterschiedlich viel Licht. Beschattungseffekte wirkten sich vor allem am südlichen Rand der Gewächshäuser aus, da hier das Licht der Dachfenster nicht direkt die Pflanzen erreichte. Der Einfluss der Lichtintensität wurde versucht niedrig zu halten, indem die Pappeln einer Linie stets in Gruppen zusammen kultiviert wurden. Bei einer hohen Anzahl an Pflanzen könnte es dennoch zu unterschiedlichen Lichtintensitäten gekommen sein. Der Standort der Pflanzen innerhalb eines Beets hatte zudem einen Einfluss auf die Bewässerung und Nährstoffzufuhr. Gut erreichbare Pflanzen am Rand erhielten möglicherweise mehr Wasser und Dünger als schwieriger erreichbare Pappeln in der Mitte des Beets. Obwohl chemischer Pflanzenschutz betrieben wurde, um den Schädlingsbefall zu reduzieren, kam es an einzelnen Pappeln zu Schädigungen durch Insekten und Spinnentiere. Wurden Jungpflanzen befallen, konnte dies einen starken Einfluss auf das Wachstum der Pappeln haben.

Zu berücksichtigen bei der Durchführung biotechnologischer Arbeiten in Deutschland sind die gesetzlichen Auflagen, die durch das Gentechnikgesetz vom 16.12.1993 geregelt werden (Purves *et al.* 2006). Feldversuche im Freiland, die insbesondere im Hinblick auf die Anwendung der produzierten Pflanzen interessant sein können, konnten in dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Die Pappeln wurden daher in unterschiedlich großen Pflanztöpfen herangezogen. Obwohl die Pappeln regelmäßig in größere Gefäße überführt wurden, wurde ihr Wachstum durch die Topfgröße limitiert, vor allem bei größeren Pflanzen.

2.12.1 Pflanzenschutz

In der Pappelmonokultur mit teilweise hoher Luftfeuchtigkeit waren Maßnahmen zum Pflanzenschutz unverzichtbar. Die bedeutsamen Schadorganismen und die eingesetzten Maßnahmen sind in Tab. 2.28 gelistet.

Tab. 2.28: Im Gewächshaus auftretende Schadorganismen und Gegenmaßnahmen

Die gegen den Hornissenglasflügler eingesetzten, hängenden Pheromonfallen waren nur mäßig zielführend. Nur wenige Tiere konnten damit gefangen werden.

Schadorganismus	Schadbild	Gegenmaßnahme
Gewächshaus-Weiße Fliege <i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Blattläsionen, bei jungen Pflanzen kapitale Schäden	Einsatz von Neudosan (Fa. Neudorff, Emmerthal) und Neem-Azal (Fa. Trifolio-M, Lahnau)
Rote Spinne <i>Panonychus ulmi</i>	Blattläsionen, eingesponnene Blätter, bei jungen Pflanzen kapitale Schäden	Einsatz von Vertimec (Fa. Syngenta, Basel, Schweiz), Neudosan und Neem-Azal
Hornissenglasflügler <i>Sesia apiformis</i>	Fraß der Larven im Wurzelhalsbereich, Absterben des gesamten Baumes	Einsatz von Perfekthion (Fa. BASF, Ludwigshafen), Pheromonfallen und Raupenleim am Wurzelhals
Rosenblattrollwespe <i>Blennocampa pusilla</i>	Eingerollte Blätter und Triebspitzen, geringer Schadumfang	Einsatz von Perfekthion
Echte Mehltaupilze <i>Erysiphales</i>	Weißer Belag auf den Blattflächen, Vertrocknen der Blätter und der gesamten Pflanze	Einsatz von Netzschwefel 80 WG (Fa. Stähler Agrochemie, Stade)

2.12.2 Datenerhebung und statistische Auswertung

Die Pappeln wurden regelmäßig im Winter nach Abschluss der Wachstumsphase und bei Bedarf vermessen. Hierbei wurde die Gesamthöhe erfasst sowie gesondert die Höhe des Haupttriebes, falls die Gesamthöhe von einem Nebentrieb bestimmt wurde. Zudem wurde der Durchmesser der Pflanzen erhoben. Auffälligkeiten im Phänotyp der Pflanzen, beispielsweise der Blattmorphologie, wurden fotografisch festgehalten.

Anhand der erhobenen Daten wurden mit Hilfe des Computerprogramms Excel (Fa. Microsoft, Redmond, USA) die Mittelwerte der Messreihen sowie ihre Standardabweichungen berechnet. Die Mittelwerte der Messreihen wurden mit Hilfe des Welch-Tests auf signifikanten Unterschied untersucht. Hierzu wurde mit den Messdaten in Excel ein T-Test durchgeführt, der die Wahrscheinlichkeit ausgab, dass das arithmetische Mittel zweier Stichproben gleich war. Bei einer Wahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurde angenommen, dass sich die Mittelwerte der zwei untersuchten Stichproben signifikant unterschieden. Beim Vergleich von transgenen Pflanzen und nicht-transgenen Kontrollen wurde so auf einen Einfluss der Transformation auf den Phänotyp der Pflanze geschlossen.

2.13 Holzanalysen

2.13.1 Holzchemische Analysen

Alle Holzanalysen wurden von Dr. Kay Hettrich und Dr. Hendrik Wetzel am Fraunhofer-Institut für angewandte Polymerforschung (IAP) in Potsdam-Golm durchgeführt. Dafür wurden Pappelsprosse in etwa 10 cm Höhe abgeschnitten und das abgeschnittene Sprossstück auf 1 m gekürzt. Gegebenenfalls

vorhandene Blätter oder Seitentriebe wurden entfernt. Das Frischgewicht wurde direkt nach der Ernte durch Wiegen ermittelt, sodass der Wassergehalt vor möglichen Veränderungen durch den Probenversand dokumentiert werden konnte. Zum Versand wurden die Sprosse in ca. 15 cm lange Abschnitte zerteilt. Im IAP wurde das Material weiterverarbeitet und mit einer Schneidmühle grob zerkleinert. Nach Lufttrocknung der Proben wurden sie mit einer Zentrifugalmühle auf 0,5 mm weiter zerkleinert und für die einzelnen Analysen aufgeteilt.

Vom Pappelmateriale wurde die Biomasse chemisch untersucht, darunter der Gehalt der energetisch interessanten Makromoleküle Lignin, Cellulose und Hemicellulosen. Diese Fraktionen wurden durch eine Ethanolextraktion gewonnen. Als Ethanol-Extraktstoffe wurden niedermolekulare Verbindungen zusammengefasst, die bei der Ethanolextraktion in Lösung gingen und sich somit nicht näher definieren ließen (K. Hettrich, IAP, persönliche Mitteilung). Für die Proteinbestimmung wurde der Stickstoff mittels Verbrennungstechnik quantifiziert und mit dem Umrechnungsfaktor 6,25 auf den Proteingehalt übertragen. Während ein niedriger Stickstoffgehalt die Verbrennungsqualität der Biomasse positiv beeinflusst, unterstützt ein höherer Stickstoffanteil den Wiederaustrieb im Frühjahr (Kauter *et al.* 2001). Der Aschegehalt wurde durch Veraschung der Biomasse im Muffelofen quantifiziert. Er beschreibt die energetisch nicht verwertbare Masse, die den Brennvorgang negativ beeinflussen sowie unerwünschte Emissionen verursachen kann und zudem als Abfallprodukt entsorgt werden muss (Kauter *et al.* 2001, Kaltschmitt *et al.* 2009).

Für die Bestimmung der einzelnen Bestandteile wurden etablierte Protokolle vom National Renewable Energy Laboratory (NREL) verwendet, genauer: NREL/TP-510-48087 - Summative Mass Closure - Laboratory Analytical Procedure Review and Integration: Feedstocks, NREL/TP-510-42620 - Preparation of Samples for Compositional Analysis, NREL/TP-510-42618 - Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass, NREL/TP-510-42619 - Determination of Extractives in Biomass, NREL/TP-510-42621 - Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples, NREL/TP-510-42622 - Determination of Ash in Biomass und NREL/TP-510-42625 - Determination of Protein Content in Biomass (K. Hettrich, IAP, persönliche Mitteilung).

Von unterschiedlichen Individuen derselben genetischen Linie wurden Mittelwerte für die einzelnen prozentualen Bestandteile gebildet. Diese wurden mit den Mittelwerten der nicht-transgenen Pflanzen verglichen. Mit Hilfe des Welch-Tests wurden sie auf signifikante Unterschiede untersucht. Bei einer Wahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurde angenommen, dass sich die Mittelwerte der zwei untersuchten Stichproben signifikant unterscheiden.

2.13.2 Holzanatomische UMSP-Analysen

Am Thünen-Institut für Holzforschung (U. Schmitt) wurden von einigen transgenen Pappeln und ihren Kontrollpflanzen UMSP-Analysen durchgeführt. Die Sprossquerschnitte zur Untersuchung wurden in 10 cm Höhe gesetzt, in Epoxidharz eingebettet und mit Toluidinblau angefärbt. Die nachfolgenden Untersuchungen basieren auf der Veröffentlichung von Koch (2004). Hier ist beschrieben, dass Lignin und phenolische Extraktstoffe im Holzgewebe durch eine UV-Spektralanalyse bei 280 nm detektiert und quantifiziert werden können. Anhand der Ergebnisse ließ sich also die Verteilung von Lignin in den sekundären Zellwänden dokumentieren.



Einjährige Pappelhybriden im Gewächshaus

3 Ergebnisse

3.1 Genetische Modifikation der MADS Box-Gene *SOC1* und *FUL*

Zur genetischen Modifikation der Blühzeitpunkt-Regulationsgene *SOC1* und *FUL* wurden insgesamt elf Transformationen durchgeführt. In der Datenbanksequenz der Pappel *P. trichocarpa* waren die entsprechenden Sequenzen bis zum Beginn des Jahres 2016 nicht annotiert. Im Fall des Kandidatengens *SOC1* wurde auf das in der Datenbanksequenz annotierte Gen von *Arabidopsis thaliana* zurückgegriffen (AT2G45660), das im Folgenden als *AtSOC1* bezeichnet wird. Für *FUL* wurde die bekannte Sequenz des Orthologs *MADSA* aus dem Weißen Senf *Sinapis alba* L. genutzt (Borner *et al.* 2000, im Folgenden als *SaFUL* bezeichnet).

Die genetischen Veränderungen zur Herunterregulation von *AtSOC1* und *SaFUL* führten zu keinen deutlichen Phänotypenänderungen. Die parallele Überexpression beider Gene führte allerdings in beiden Versuchsklonen Esch5 und P1 zu stark beeinflussten Phänotypen und signifikant kleineren Pflanzen. Unterdessen zeigten die Versuche zur einfachen Überexpression eines der beiden Kandidatengene keine auffälligen Phänotypen.

3.1.1 Genetische Modifikation von *SOC1*

3.1.1.1 Herunterregulation

Zur Herunterregulation von *SOC1* wurden zwei Transformationen mit dem Vektor A179 durchgeführt. Dieser Transformationsvektor kodierte neben dem Kanamycinresistenzgen *NPTII* zur Selektion für die RNA-Interferenz zum *Knockdown* von Potri.003G119700. Hierbei handelte es sich um ein Pappel-Paralog von *SOC1*. Bis zur Annotation dieses Gens in der Datenbanksequenz von *P. trichocarpa* (Potri.012G133000) wurde dieses Gen nach den Ergebnissen einer *BLAST*-Analyse als *AtSOC1*-Ortholog angenommen. Das Gen wird im Folgenden mit *PtSOC1.P* („P“ für „Paralog“) bezeichnet. Der *Knockdown*-Ansatz wurde in der Transformation N 266 mit dem Empfängerorganismus Esch5 (*P. tremula* × *P. tremuloides*) sowie in der Transformation N 271 mit dem Empfängerorganismus P1 (*P. × canescens*) durchgeführt.

Molekulargenetische Untersuchungen

Der Transformationserfolg wurde auf molekulargenetischer Ebene überprüft, indem sowohl das Resistenz- (Abb. 3.1) als auch das Zielgen (Abb. 3.2) nachgewiesen wurden, wie nachfolgend exemplarisch für N 266 dargestellt. Von insgesamt 19 putativ transgenen Regeneraten aus beiden Transformationen wurde der transgene Status in zwölf Sublinien verifiziert.

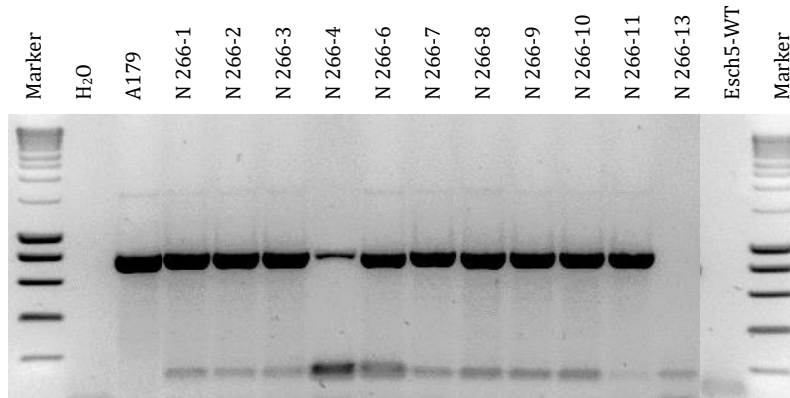


Abb. 3.1: Gelelektrophoretischer Nachweis des Selektionsmarkers *NPTII*

Die PCR wurde mit den Primern #317 und #318 bei einer *Annealing*-Temperatur von 56 °C und mit 40 Amplifikationszyklen durchgeführt. 5 µL der PCR-Produkte wurden auf einem 1,3% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. Bis auf N 266-13 enthielten alle überprüften Sublinien das Resistenzgen.

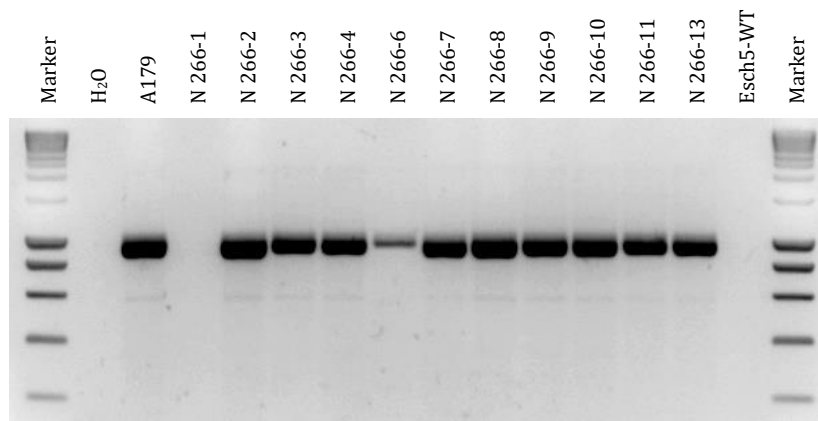


Abb. 3.2: Gelelektrophoretischer Nachweis des Zielgens *PtSOC1.P*

Die PCR wurde mit den Primern #1241 und #1245 bei einer *Annealing*-Temperatur von 54 °C und mit 40 Amplifikationszyklen durchgeführt. 5 µL der PCR-Produkte wurden auf einem 1,3% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. Das Ergebnis der PCR zum Nachweis des Zielgens war für die zehn Sublinien N 266-2 bis N 266-13 positiv, für N 266-1 negativ. Für N 266-1 wurde der Nachweis des Zielgens in einer Wiederholung der PCR erbracht (ohne Abbildung).

Zur Quantifizierung der transgenen Kopienzahlen in den Sublinien von N 266 wurde ein Southern Blot durchgeführt. Das Blot wurde mit der Sonde für *Pt.SOC1.P* hybridisiert (Abb. 3.3). Als Test auf Übereinstimmung wurde die obenstehende Membran nach einem Stripping mit der Sonde für das Markergen *NPTII* hybridisiert. Das Ergebnis entsprach dem Ergebnis des Blots mit der Sonde für das Zielgen *PtSOC1.P*. Insgesamt wurden sechs Sublinien identifiziert, bei denen eine Kopie der T-DNA ins Genom integriert wurde, sowie fünf Sublinien mit zwei Kopien (Tab. 3.1).

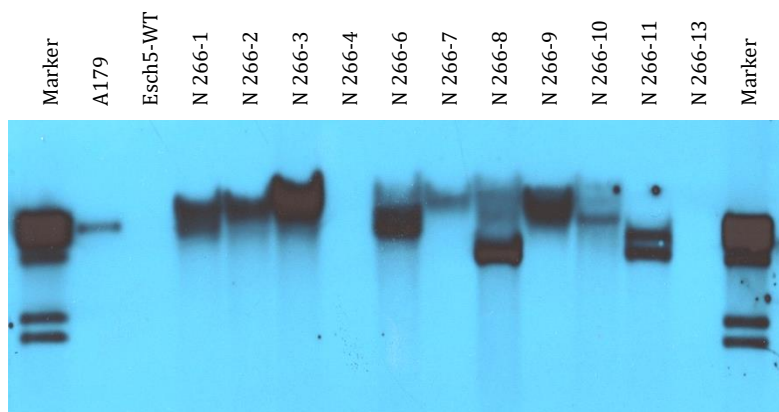


Abb. 3.3: Southern Blot zur Quantifizierung der Kopienanzahl in N 266

Die DNA für dieses Southern Blot wurde mit *Bsp*EI restringiert. Die Digoxigenin-markierte Sonde bindet im Zielgen *Pt.SOCLP* und wurde mit den Primern #1244 und #1245 synthetisiert. Die Sonde ist 780 bp lang. Als Fragmentlängenmarker wurde der DIG-Marker II (Fa. Roche, Mannheim) verwendet. Die Linien N 266-4 und N 266-13 enthielten keine Kopien der T-DNA.

Tab. 3.1: Ermittelte Kopienzahlen in unabhängigen transgenen Linien von N 266 und N 271

Per Southern Blot-Analyse wurden die Kopienzahlen der T-DNA von A179 im Pappelgenom quantifiziert. In N 266-4 und -13 konnten keine Kopien der T-DNA nachgewiesen werden.

Kopienzahl der T-DNA	Transgene Linien	
1	N 266-3, -6, -7, -9, -10	N 271-1
2	N 266-1, -2, -8, -11	N 271-2

Phänotypisierung

Zur Analyse der Pflanzen unter naturnahen Bedingungen außerhalb der Gewebekultur wurden zahlreiche Pflanzen von N 266 und N 271 zusammen mit nicht-transgenen Kontrollpflanzen ins Gewächshaus überführt. Nach elfmonatiger Kultivierung wurde die Gesamthöhe der Pappellinie N 266 gemessen. Die Pflanzen der Sublinie N 266-11 wurden als signifikant größer ermittelt, allerdings bildeten hier lediglich zwei Pflanzen den Stichprobenumfang. Nach insgesamt 23 Monaten, am Ende der zweiten Vegetationsperiode, wurde die Gesamthöhe erneut gemessen. Signifikante Mittelwertabweichungen wurden nicht beobachtet (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linie N 266 im Gewächshaus

Die Gesamthöhen der Pappeln wurden nach 11- bzw. 23-monatiger Kultivierung am Ende der ersten bzw. zweiten Vegetationsperiode erhoben. Eine signifikante Mittelwertabweichung ($p \leq 0,05$) wurde bei der ersten Messung von N 266-11 erreicht, ansonsten von keinen anderen untersuchten Linien.

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standard-abweichung [cm]	p	Signifikanz
11 Monate Kultur, eine Vegetationsperiode						
Kontrollen	4	123	118	16		
N 266-3	4	150	148	32	0,25	nein
N 266-6	7	123	131	48	0,98	nein
N 266-7	4	138	127	23	0,40	nein
N 266-9	5	164	160	31	0,06	nein
N 266-10	4	146	166	43	0,43	nein
N 266-11	2	174	174	4	0,01	ja, signifikant größer

Tab. 3.2: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linie N 266 im Gewächshaus (Fortsetzung)

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standard-abweichung [cm]	p	Signifikanz
23 Monate Kultur, zwei Vegetationsperioden						
Kontrollen	3	225	250	88		
N 266-3	4	335	363	64	0,22	nein
N 266-6	2	255	255	74	0,79	nein
N 266-7	2	330	330	3	0,24	nein
N 266-9	5	338	343	33	0,21	nein
N 266-10	5	309	321	21	0,31	nein
N 266-11	2	361	361	27	0,15	nein

Die Pappeln der Linie N 271 wurden nach zehn- und 22-monatiger Kultivierung vermessen. In beiden Messungen wurden keine signifikanten Mittelwertabweichungen beobachtet (Tab. 3.3).

Tab. 3.3: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linie N 271 im Gewächshaus

Die Gesamthöhen der Pappeln wurden nach zehn und 22 Monaten gemessen. Die Mittelwerte von N 271-1 und N 271-2 wichen nicht signifikant von den Mittelwerten der nicht-transgenen Kontrollpflanzen ab ($p > 0,05$).

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standard-abweichung [cm]	p	Signifikanz
10 Monaten Kultur, eine Vegetationsperiode						
Kontrollen	5	143	139	16		
N 271-1	4	144	142	12	0,91	nein
N 271-2	5	146	148	18	0,77	nein
22 Monaten Kultur, zwei Vegetationsperioden						
Kontrollen	5	319	324	32		
N 271-1	4	343	359	38	0,43	nein
N 271-2	5	307	326	66	0,75	nein

An einzelnen Pappeln wurden im Frühjahr 2016 Kätzchen mit weiblichen Blüten gefunden (Abb. 3.4). Folgende Pflanzen, die seit Januar bzw. Februar 2013 im Gewächshaus waren, zeigten bereits nach etwa drei Jahren eine Entwicklung von Kätzchen: 11777 (N 266-7), 12723, 12728 (beide N 266-9), 12742 (N 266-11). Da Pappeln in der Regel erst nach vier bis 15 Jahren eine Blütenentwicklung zeigen (DiFazio *et al.* 2011), handelte es sich hierbei um frühblühende Pappeln.

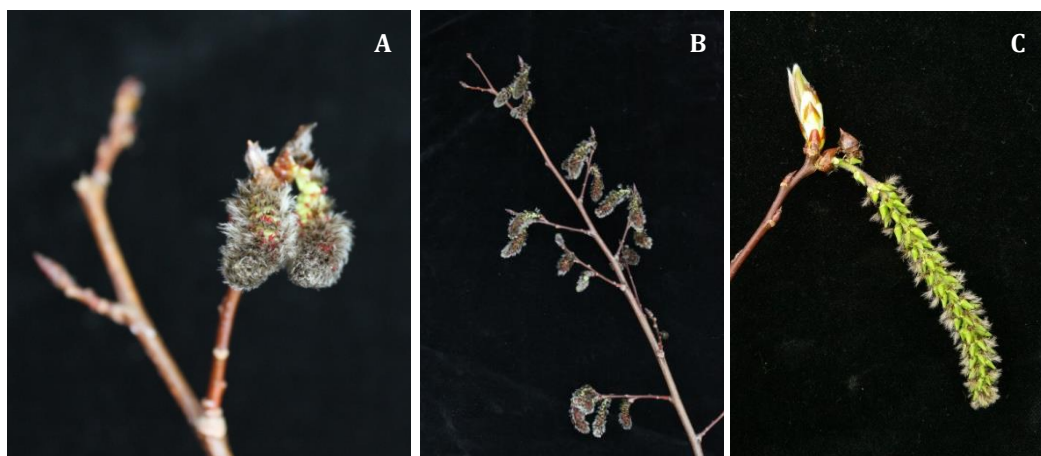


Abb. 3.4: Kätzchen an Pappeln der Linie N 266

Im Frühjahr 2016 wurden Kätzchen gefunden bei: A) Pappel 11777, Linie N 266-7, im Januar 2013 ins Gewächshaus überführt; B) Pappel 12723, N 266-9, im Februar 2013 ins Gewächshaus überführt; C) Pappel 11793, N 266-11, im Januar 2013 ins Gewächshaus überführt. Da Pappeln in der Regel erst nach vier bis 15 Jahren eine Blütenentwicklung zeigen (DiFazio *et al.* 2011), handelte es sich hierbei um frühblühende Pappeln.

Holzchemische Analysen

Sechs ausgewählte Individuen wurden nach Abschluss der zweiten Vegetationsperiode zur biochemischen Untersuchung der Biomasse an das Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung (Potsdam, K. Hettrich) übergeben: 11769, 11771 und 12710 (N 266-6) sowie 11818, 11819 und 11821 (nicht-transgene Kontrollpflanzen). Die Holzuntersuchung ergab keine signifikante Mittelwertabweichung für einen der Bestandteile (Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Prozentuale chemische Zusammensetzung des Sprossgewebes von drei Individuen der Linie N 266-6

Die Mittelwerte der einzelnen Bestandteile entsprechen etwa den Mittelwerten der nicht-transgenen Kontrollpflanzen, die ebenfalls auf drei Individuen basieren. Eine signifikante Abweichung ($p \leq 0,05$) lag nicht vor. Die Analysen wurden am Fraunhofer IAP durchgeführt (K. Hettrich). Abkürzungen: M - Mittelwert, s - Standardabweichung, p - Irrtumswahrscheinlichkeit für signifikante Abweichung.

Bestandteile	N 266-6			Nicht-transgene Kontrollen	
	M	s	p	M	s
Asche	3,0	0,1	0,60	3,0	0,1
Protein	5,2	0,4	0,33	3,9	1,4
Ethanol-Extraktstoffe	13,3	0,4	0,32	17,8	4,8
Cellulose	33,8	1,1	0,27	30,4	3,3
Hemicellulose	20,1	0,8	0,46	20,6	0,2
Lignin	17,5	0,4	0,78	17,6	0,4

Die Sprosse der drei Individuen 14130, 14131 und 14132 der Linie N 271-1 wurden ebenfalls nach der zweiten Vegetationsperiode auf ihre biochemischen Bestandteile untersucht. Auch hierbei wurde keine signifikante Abweichung der Zusammensetzung im Vergleich zu nicht-transgenen Kontrollpflanzen festgestellt (Tab. 3.5).

Tab. 3.5: Prozentuale chemische Zusammensetzung des Sprossgewebes von drei Individuen der Linie N 271-1

Die Mittelwerte der einzelnen Bestandteile entsprechen etwa den Mittelwerten der nicht-transgenen Kontrollpflanzen, die ebenfalls anhand von drei Pflanzen berechnet wurden. Eine signifikante Abweichung ($p \leq 0,05$) lag nicht vor. Die Analysen wurden am Fraunhofer IAP durchgeführt (K. Hettrich). Abkürzungen: M - Mittelwert, s - Standardabweichung, p - Irrtumswahrscheinlichkeit für signifikante Abweichung.

Bestandteile	N 271-1			Nicht-transgene Kontrollen	
	M	s	p	M	s
Asche	2,6	0,1	0,81	2,6	0,1
Protein	4,4	0,4	0,91	4,5	1,6
Ethanol-Extraktstoffe	17,3	1,3	0,15	15,2	1,0
Cellulose	32,5	1,6	0,30	34,5	1,8
Hemicellulose	19,6	0,3	0,09	20,8	0,6
Lignin	17,2	0,1	0,79	17,2	0,3

Die Transformationen zum *Knockdown* von *PtSOC1.P* per RNA-Interferenz führten bei den Pappeln nicht zu einer signifikanten Veränderung des Phänotyps, d. h. weder in der Pflanzenhöhe (nur bei N 266-11), noch in der Zusammensetzung der Biomasse. Einzelne Pflanzen der Linien N 266-7, -9 und -11 zeigten allerdings eine frühe Blüte.

3.1.1.2 Überexpression

Für die Überexpression von *AtSOC1* wurde der Transformationsvektor A122 verwendet, der die Kanamycinresistenz *NPTII* zur Selektion enthielt. Für den Vektor lag keine DNA-Sequenz oder Vektorkarte vor, sodass der Vektor durch Primerwalking sequenziert wurde. Seine DNA-Sequenz ist im Anhang aufgeführt. Eine alleinige Transformation mit diesem Vektor wurde im Rahmen dieser Studie nicht durchgeführt, da zum einen bereits zuvor durchgeführte Transformationen mit Hybridpappeln keine Hinweise darauf ergaben, dass dies zu signifikanten Phänotypenveränderungen führt, zum anderen da während der geplanten Doppeltransformationen mit einfach-transgenen Sublinien zu rechnen war.

Die detaillierten Ergebnisse zur alleinigen Überexpression von *SOC1* sind dem Kapitel 3.1.3.2 zur parallelen Überexpression von *SOC1* und *FUL* zu entnehmen. Bei den Transformationen N 352 und N 407 entstanden auf Grundlage des *P. × canescens*-Klons P1 neben doppeltransgenen Pappeln mit N 352-1, -4, -5 und -6 sowie N 407-1 auch Linien, die sich im Laufe der Untersuchungen als einfach-transgen für die Überexpression von *SOC1* herausstellte. Die Pappeln dieser Linien hatten keinen auffälligen Phänotyp (Abb. 3.5 für N 407-1) und zeigten nach der Kultivierung im Gewächshaus keine signifikante Unterschiede in der Pflanzenhöhe (Tab. 3.6 für N 352).



Abb. 3.5: Vergleich der Pflanzen N 407-1 zu den nicht-transgenen Kontrollpflanzen

Die Pappeln der Linie N 407-1 unterschieden sich nach 25 Wochen Kultivierung nicht signifikant von den nicht-transgenen Kontrollpflanzen ($p = 0,66$). Abgebildet sind von links nach rechts die kleinste, die mediane und die größte Pappel sowie die mediane Kontrollpflanze (Pappeln 22310, 22311, 22309 und 22304 als Kontrolle).

Während die Analysen der Linien von N 352 in Kapitel 3.1.3.2 unter der parallelen Überexpression von *AtSOC1* und *SaFUL* zusammengefasst sind, soll hier dargestellt werden, dass die einzeltransgenen Linien, die aus der Doppel-Transformation entstanden waren, keinen signifikant abweichenden Phänotyp hatten. Es handelte sich dabei um die Linien N 352-1, -4, -5 und -6, von denen zahlreiche Pflanzen ins Gewächshaus überführt und nach 26- bzw. 44-wöchiger Kultivierung vermessen wurden (Tab. 3.6).

Tab. 3.6: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linie N 352 im Gewächshaus

Die Gesamthöhen der Pappeln wurden nach 26 Wochen Kultivierung erhoben. Signifikante Mittelwertabweichungen ($p \leq 0,05$) zwischen den nicht-transgenen Kontrollen und transgenen Pappeln wurden nicht beobachtet.

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standard-abweichung [cm]	p	Signifikanz
26 Wochen Kultivierung (6 Monate)						
Kontrollen	12	106	107	8		
N 352-1	5	98	107	16	0,39	nein
N 352-4	7	107	108	6	0,73	nein
N 352-5	6	100	109	25	0,62	nein
N 352-6	8	107	112	14	0,81	nein
44 Wochen Kultivierung (10 Monate)						
Kontrollen	12	212	213	5		
N 352-1	5	217	217	6	0,18	nein
N 352-4	7	208	209	10	0,43	nein
N 352-5	6	197	206	17	0,11	nein
N 352-6	8	207	211	16	0,42	nein

Die Überexpression von *AtSOC1* führte in Pappeln nicht zu signifikant veränderten Phänotypen.

3.1.2 Genetische Modifikation von *FUL*

3.1.2.1 Herunterregulation

Zum *Knockdown* von *FUL* wurden drei Transformationen mit dem Vektor A180 durchgeführt, der neben dem Kanamycinresistenzgen *NPTII* zur Selektion für die RNA-Interferenz zum *Knockdown* von Potri.017G099800 kodierte. Resultierend aus einer *BLAST*-Analyse wurde das Gen Potri.017G099800 als Ortholog zu *SaFUL* bzw. *AtFUL* angesehen, bis das Gen *FUL* in der Datenbanksequenz von *P. trichocarpa* annotiert wurde. Mittlerweile wurden zwei Homologe von *PtFUL* in der Datenbanksequenz annotiert (Potri.008G098500 / *PtAGL8.1* und Potri.010G154100 / *PtAGL8.2*). Das ausgesuchte Gen Potri.017G099800 wurde als Paralog von *PtFUL* identifiziert. Es lag in der Datenbank als *PtMADS12.7* annotiert vor und wird im Folgenden als *PtFUL.P* („P“ für „Paralog“) bezeichnet. Die *Knockdown*-Ansätze wurden sowohl mit dem *P. tremula* × *P. tremuloides*-Klon Esch5 (N 267) als auch mit dem *P. × canescens*-Klon P1 (N 272 und N 316) durchgeführt.

Molekulargenetische Untersuchungen

Der Transformationserfolg wurde auf molekulargenetischer Ebene verifiziert, indem der Selektionsmarker *NPTII* (Abb. 3.6) und das Zielgen *PtFUL.P* (Abb. 3.7) nachgewiesen wurden, wie im Folgenden exemplarisch für N 267 gezeigt wird. Aus allen drei Transformationen wurden insgesamt neun putativ transgene Regenerate erhalten, die allesamt als transgen bestätigt wurden.

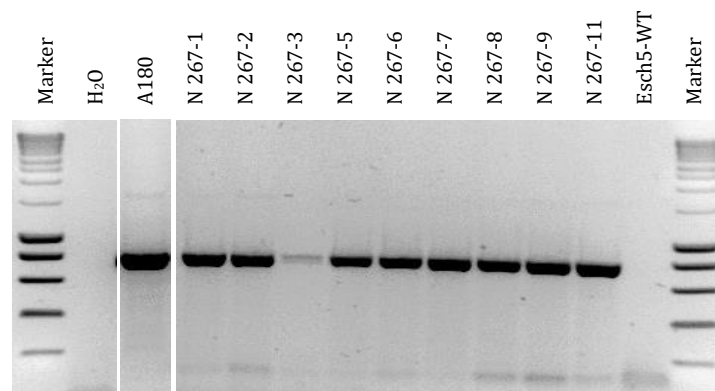


Abb. 3.6: Gelelektrophoretischer Nachweis des Selektionsmarkers *NPTII*

Die PCR wurde mit den Primern #317 und #318 bei einer *Annealing*-Temperatur von 56 °C und mit 40 Amplifikationszyklen durchgeführt. 5 µL der PCR-Produkte wurden auf einem 1,3% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. Alle überprüften Sublinien von N 267 enthielten das Resistenzgen.

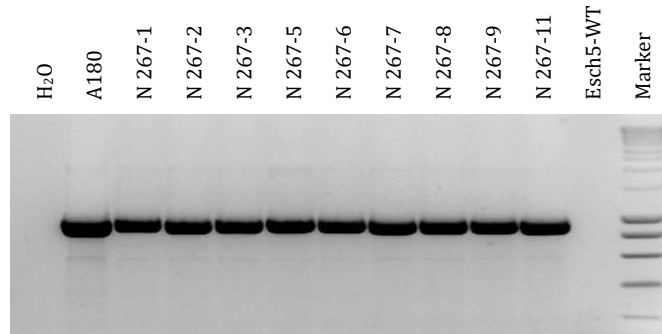


Abb. 3.7: Gelelektrophoretischer Nachweis des Zielgens *PtFUL.P*

Die PCR wurde mit den Primern #31b und #438 bei einer *Annealing*-Temperatur von 56 °C und mit 40 Amplifikationszyklen durchgeführt. 5 µL der PCR-Produkte wurden auf einem 1,3% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. Das Ergebnis der PCR zum Nachweis des Zielgens entsprach dem Resistenznachweis und war für alle getesteten neun Sublinien positiv.

Per Southern Blot wurden die Kopienzahlen quantifiziert, mit denen die T-DNA in den Sublinien vorlag, wie exemplarisch für die Transformanten der Linie N 267 gezeigt ist (Abb. 3.8). Im Fall von N 267 wurde das Southern Blot sowohl mit einer Sonde für das Zielgen als auch für das Resistenzgen hybridisiert. Da die Ergebnisse deckungsgleich waren, wurde folgend nur noch mit der Sonde für das Resistenzgen hybridisiert. Insgesamt waren in zehn der Sublinien jeweils eine Kopie der T-DNA integriert, in einer Sublinie zwei Kopien und drei Kopien in zwei Sublinien (Tab. 3.7).

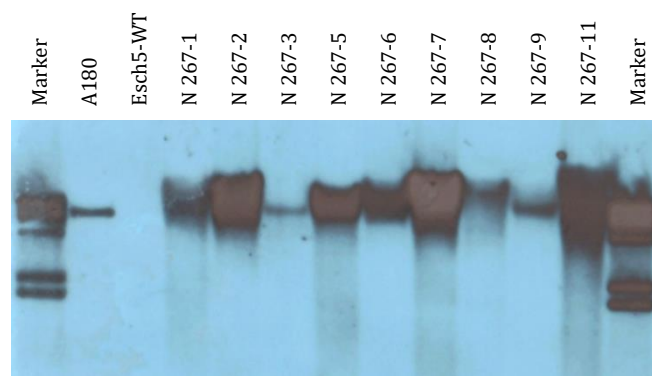


Abb. 3.8: Southern Blot zur Quantifizierung der Kopienanzahl in N 267 mit Resistenzmarker-Sonde

Die DNA für dieses Southern Blot wurde mit *BspEI* restringiert. Die Digoxigenin-markierte Sonde hybridisierte mit dem Markergen *NPTII* und wurde mit den Primern #317 und #318 synthetisiert. Die Sonde ist 780 bp lang. Als Fragmentlängenmarker wurde der DIG-Marker II (Fa. Roche, Mannheim) verwendet. Die Hybridisierungsmembran war zuvor mit der Sonde für *PtFUL.P* hybridisiert und wurde einmal gestrippt.

Tab. 3.7: Ermittelte Kopienzahlen in unabhängigen transgenen Linien von N 267, N 272 und N 316

Per Southern Blot-Analyse wurden die Kopienzahlen der T-DNA von A180 im Pappelgenom quantifiziert.

Kopienzahl der T-DNA	Transgene Linien
1	N 267-1, -3, -5, -7, -8, -9, -11 N 272-1 N 316-1, -9b
2	N 267-6
3	N 267-2 N 272-4

Phänotypisierung

Zur Analyse der Pflanzen unter naturnahen Bedingungen außerhalb der Gewebekultur wurden zahlreiche Pflanzen von ausgewählten Sublinien zusammen mit nicht-transgenen Kontrollpflanzen ins Gewächshaus überführt und hier kultiviert.

Nach zehn und insgesamt 22 Monaten, am Ende der jeweiligen Vegetationsperioden, wurde die Gesamthöhe der Pappeln gemessen (Tab. 3.8). Eine signifikante Abweichung konnte nur bei N 267-9 ($p = 0,02$) nach zehnmonatiger Kultivierung ermittelt werden. Darüber hinaus wurden keine signifikanten Abweichungen ($p \leq 0,05$) der transgenen Pflanzen der Linie N 267 zu den Kontrollpflanzen festgestellt. Die Vermessungen der kultivierten Pappeln von N 272 und N 316-9b offenbarten ebenfalls keine signifikanten Mittelwertabweichungen der beiden transgenen Linien im Vergleich zu den nicht-transgenen Kontrollpflanzen.

Tab. 3.8: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen zur Herunterregulation von *PtFUL.P* im Gewächshaus

Die Gesamthöhen der Pappeln wurden nach einer und zwei Vegetationsperioden erhoben, im Fall von N 316-9b nur nach einer Vegetationsperiode. Eine signifikante Mittelwertabweichung wurde bei N 267-9 beobachtet ($p = 0,02$), ansonsten wichen die Mittelwerte nicht signifikant von den nicht-transgenen Wildtypen ab.

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standardabweichung [cm]	p	Signifikanz
10 Monate Kultur, eine Vegetationsperiode						
Kontrollen	3	151	154	9		
N 267-1	10	169	170	19	0,10	nein
N 267-2	10	143	144	15	0,37	nein
N 267-3	2	167	167	9	0,28	nein
N 267-5	5	127	136	42	0,33	nein
N 267-7	9	125	122	29	0,06	nein
N 267-8	6	140	160	48	0,64	nein
N 267-9	7	182	185	19	0,02	ja, signifikant größer
N 267-11	5	169	181	36	0,40	nein
22 Monate Kultur, zwei Vegetationsperioden						
Kontrollen	3	245	251	17		
N 267-1	8	321	349	82	0,05	nein
N 267-2	8	286	320	90	0,29	nein
N 267-3	2	358	358	26	0,09	nein
N 267-5	4	301	313	89	0,82	nein
N 267-7	6	251	250	48	0,81	nein
N 267-8	3	322	356	69	0,25	nein
N 267-9	4	309	330	48	0,10	nein
N 267-11	2	288	288	6	0,06	nein

Tab. 3.8: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen zur Herunterregulation von *PtFUL.P* im Gewächshaus (Fortsetzung)

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standardabweichung [cm]	p	Signifikanz
10 Monate Kultur, eine Vegetationsperiode						
Kontrollen	6	195	195	7		
N 272-1	8	194	197	24	0,92	nein
N 272-4	7	206	207	15	0,14	nein
22 Monate Kultur, zwei Vegetationsperioden						
Kontrollen	4	327	326	11		
N 272-1	4	341	338	22	0,36	nein
N 272-4	4	294	301	42	0,27	nein
10 Monate Kultur, eine Vegetationsperiode						
Kontrollen	8	242	243	28		
N 316-9 b	5	220	211	25	0,21	nein

Im Frühjahr 2016 wurde ein Individuum entdeckt, das Kätzchen mit weiblichen Blüten bildete: Das Individuum 12807 (N 267-7) blühte nach bereits drei Jahren Kultivierung im Gewächshaus (frühe Blüte), obwohl Pappeln in der Regel erst nach vier bis 15 Jahren blühen (DiFazio *et al.* 2011).

Holzchemische Analysen

Von den drei Pappeln 12039, 12796 und 12797 der Linie N 267-5 wurde nach Abschluss der zweiten Vegetationsperiode die biochemische Zusammensetzung der Sprosse untersucht. Dazu wurde das Pflanzenmaterial an das Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung (IAP, K. Hettrich) in Potsdam übergeben. Signifikante Abweichungen ($p \leq 0,05$) im Vergleich zu den nicht-transgenen Kontrollpflanzen wurden nicht festgestellt (Tab. 3.9).

Tab. 3.9: Prozentuale chemische Zusammensetzung des Sprossgewebes der Linie N 267-5

Von den transgenen Pappeln und den Kontrollpflanzen wurden jeweils drei Individuen untersucht. Die Mittelwerte der einzelnen Bestandteile entsprachen etwa den Mittelwerten der nicht-transgenen Kontrollpflanzen. Signifikante Abweichungen ($p \leq 0,05$) lagen nicht vor. Die Analysen wurden am Fraunhofer IAP durchgeführt (K. Hettrich). Abkürzungen: M - Mittelwert, s - Standardabweichung, p - Irrtumswahrscheinlichkeit für signifikante Abweichung.

Bestandteile	N 267-5			Nicht-transgene Kontrollen	
	M	s	p	M	s
Asche	2,8	0,2	0,27	3,0	0,1
Protein	3,9	2,2	1,00	3,9	1,4
Ethanol-Extraktstoffe	14,0	0,2	0,38	17,8	4,8
Cellulose	34,1	1,1	0,25	30,4	3,3
Hemicellulose	21,4	1,3	0,45	20,6	0,2
Lignin	17,8	0,9	0,79	17,6	0,4

Eine Transformation zum *Knockdown* von *PtFUL.P* per RNAi hatte bis auf einen Ausnahmefall keine signifikanten Auswirkungen auf den Phänotyp der Pappeln. Ein Individuum mit einer früheren Blütenbildung, als es üblicherweise bei dreijährigen Pappeln vorkommt, wurde beobachtet.

3.1.2.2 Überexpression

Vor Beginn dieser Studie wurde bereits die Transformation N 68 zur Überexpression von *SaFUL* mit dem Vektor A137 im Pappelhybrid-Klon Esch5 durchgeführt. Der Transformationsvektor enthielt das Kanamycinresistenzgen *NPTII* zur Selektion. Für den Vektor A137 lag keine DNA-Sequenz oder Vektorkarte vor, sodass der Vektor durch Primerwalking sequenziert wurde. Seine DNA-Sequenz ist im Anhang aufgeführt. Diverse Pappeln wurden nach Verifizierung des Transformationserfolgs mittels PCR-Nachweis von Resistenzmarker und Zielgen zur Kultivierung unter naturnahen Bedingungen zusammen mit ihren nicht-transgenen Kontrollpflanzen ins Gewächshaus überführt.

Phänotypisierung

Nach Abschluss der jährlichen Vegetationsperioden wurde die Gesamthöhe der Pappeln gemessen. Wurden nach der ersten Vegetationsperiode noch signifikante Mittelwertabweichungen festgestellt, waren alle Sublinien nach der zweiten Vegetationsperiode durchschnittlich den Wildtypen entsprechend (Tab. 3.10). Nach der dritten Vegetationsperiode waren zwei Sublinien signifikant kleiner als die Kontrollen, darunter auch eine Linie, die nach der ersten Vegetationsperiode noch signifikant größer war. Signifikante Mittelwertabweichungen blieben nicht über eine Vegetationsperiode hinaus bestehen (Abb. 3.9).

Tab. 3.10: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linie N 68 im Gewächshaus

Die Gesamthöhen der Pappeln wurden jeweils am Ende der jährlichen Vegetationsperiode erhoben. Signifikante Mittelwertabweichungen ($p \leq 0,05$) mit größeren Pappeln traten nach der ersten Vegetationsperiode auf, wurden nach der zweiten Vegetationsperiode allerdings nicht mehr beobachtet. Nach der dritten Vegetationsperiode wurden zwei signifikant kleinere Linien ermittelt, wobei dies wahrscheinlich auf die Kultivierung und ihren Standort im Gewächshaus zurückzuführen war.

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standard-abweichung [cm]	p	Signifikanz
5 Monate Kultur, eine Vegetationsperiode						
Kontrollen	7	78	77	15		
N 68-1	17	105	112	26	0,01	ja, signifikant größer
N 68-2	15	131	139	23	0,00	ja, signifikant größer
N 68-3	6	147	150	6	0,00	ja, signifikant größer
N 68-4	21	117	122	13	0,00	ja, signifikant größer
N 68-7	18	81	85	14	0,71	nein
N 68-8	19	87	96	29	0,34	nein
N 68-9	18	108	116	22	0,00	ja, signifikant größer
17 Monate Kultur, zwei Vegetationsperioden						
Kontrollen	7	198	213	37		
N 68-1	17	204	203	24	0,68	nein
N 68-2	14	186	205	55	0,61	nein
N 68-3	6	202	202	10	0,77	nein
N 68-4	21	228	223	20	0,09	nein
N 68-7	18	226	232	29	0,12	nein
N 68-8	19	177	195	46	0,30	nein
N 68-9	18	209	218	49	0,56	nein

Tab. 3.10: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linie N 68 im Gewächshaus (Fortsetzung)

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standardabweichung [cm]	P	Signifikanz
29 Monate Kultur, drei Vegetationsperioden						
Kontrollen	7	296	307	30		
N 68-1	17	280	274	38	0,33	nein
N 68-2	14	224	220	34	0,00	ja, signifikant kleiner
N 68-3	6	262	271	30	0,10	nein
N 68-4	21	296	301	23	0,99	nein
N 68-7	18	292	299	32	0,81	nein
N 68-8	19	211	212	53	0,00	ja, signifikant kleiner
N 68-9	18	279	306	83	0,48	nein

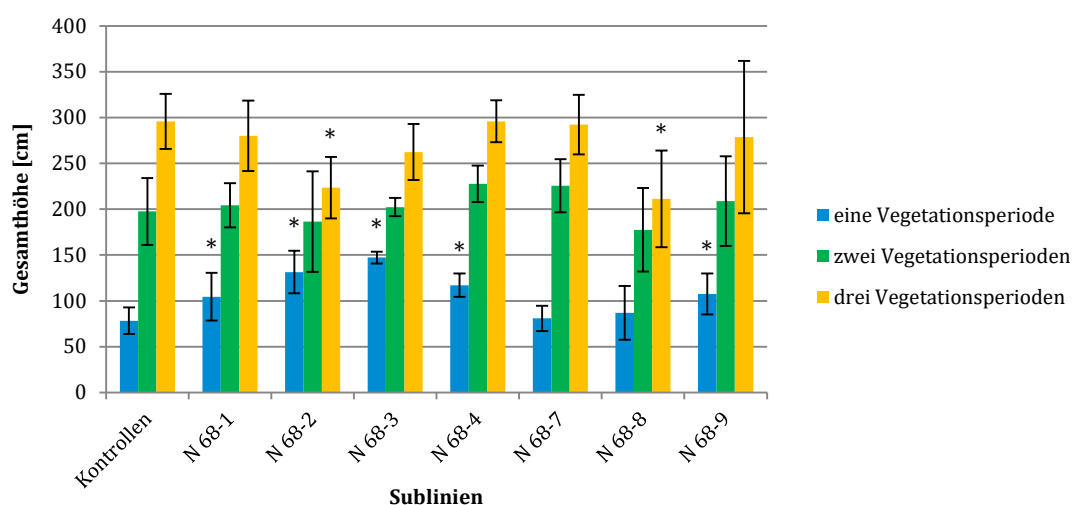


Abb. 3.9: Entwicklung der Gesamthöhe von N 68-Sublinien über die dreijährige Kulturdauer

Die Messdaten wurden am Ende der jeweiligen Vegetationsperiode erhoben. Signifikant abweichende Linien ($p \leq 0,05$) sind mit * markiert. Die Fehlerindikatoren markieren die Standardabweichungen der Mittelwerte. Während nach der ersten Vegetationsperiode fünf signifikant größere Sublinien beobachtet wurden, waren nach der zweiten Vegetationsperiode keine Sublinien signifikant abweichend, nach der dritten zwei Sublinien wiederum signifikant kleiner.

Eine frühe Blütenentwicklung der Pappeln wurde nicht beobachtet. Einige Exemplare unterschiedlicher Sublinien blühten ab dem Frühjahr 2014, also nach sechsjähriger Kultivierung im Gewächshaus. Dies war allerdings keine besondere Auffälligkeit.

Die Überexpression von *SaFUL* führte nicht zu konsistent signifikant veränderten Phänotypen. Während zunächst einige Linien signifikant größer waren, war die Signifikanz nach einer weiteren Vegetationsperiode wieder aufgehoben.

3.1.3 Parallele genetische Modifikation von *SOC1* und *FUL*

3.1.3.1 Parallele Herunterregulation

Bereits vor Beginn dieser Studie wurden Transformationen durchgeführt, um *SOC1* und *FUL* parallel herabzuregulieren und damit die Ergebnisse von Melzer *et al.* (2008) im Modellsystem Pappel

nachvollziehen zu können. Hierfür wurde der Transformationsvektor A156 verwendet. Er kodiert für die RNA-Interferenz zum *Knockdown* von *AtSOC1* und *SaFUL* sowie für die Kanamycinresistenz *NPTII* zur Selektion. Empfängerorganismus für die beiden Transformationen N 141 und N 145 war der *P. tremula* × *P. tremuloides*-Klon Esch5.

Molekulargenetische Untersuchungen

Der Transformationserfolg wurde verifiziert, indem die putativ transgenen Linien auf Anwesenheit des Selektionsmarkers *NPTII* (Abb. 3.10) und des Zielgens (Abb. 3.11) überprüft wurden, wie im Folgenden exemplarisch für N 145 gezeigt wird. Alle sechs getesteten Sublinien enthielten das Resistenzgen, vier der Linien zudem das Zielgen.

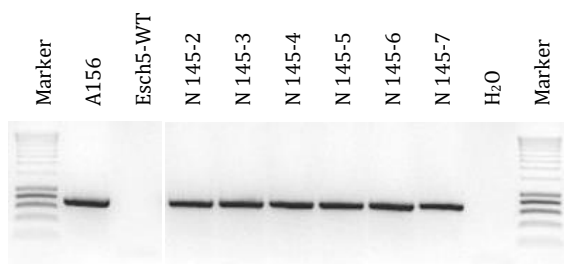


Abb. 3.10: Gelelektrophoretischer Nachweis des Selektionsmarkers *NPTII*

Die PCR wurde mit den Primern #343 und #344 bei einer *Annealing*-Temperatur von 62 °C und mit 40 Amplifikationszyklen durchgeführt. 5 µL der PCR-Produkte wurden auf einem 1,2% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. Alle getesteten Sublinien enthielten das Resistenzgen *NPTII*.

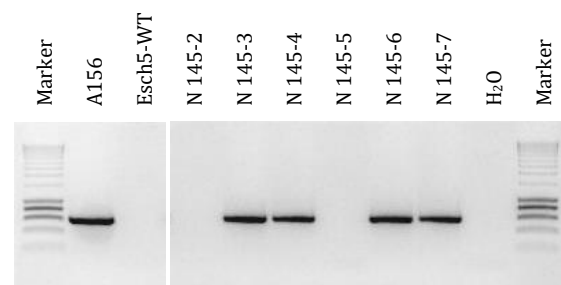


Abb. 3.11: Gelelektrophoretischer Nachweis des Zielgens

Die PCR wurde mit den Primern #1244 und #1368 bei einer *Annealing*-Temperatur von 54,5 °C und mit 40 Amplifikationszyklen durchgeführt. 5 µL der PCR-Produkte wurden auf einem 1,2% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. In vier der sechs getesteten Sublinien wurde das Zielgen nachgewiesen.

Zur Quantifizierung der Kopienzahlen, mit denen die T-DNA in den transgenen Sublinien vorlag, wurden Southern Blots mit einer Sonde zur Hybridisierung an *NPTII* durchgeführt (Abb. 3.12). Die ermittelten Kopienzahlen sind in Tab. 3.11 zusammengefasst.

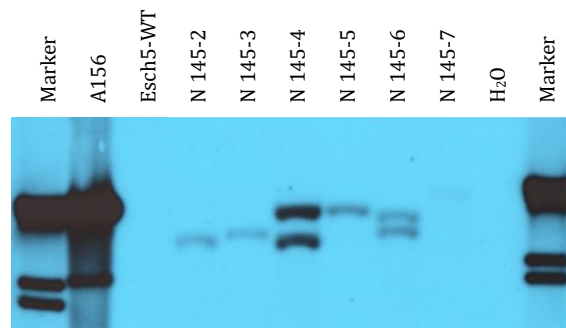


Abb. 3.12: Southern Blot zur Quantifizierung der Kopienanzahl in N 145

Die DNA für dieses Southern Blot wurde mit *XbaI* restringiert. Die Digoxigenin-markierte Sonde bindet im Markergen *NPTII* und wurde mit den Primern #317 und #318 synthetisiert. Die Sonde ist 780 bp lang. Als Fragmentlängenmarker wurde der DIG-Marker II (Fa. Roche, Mannheim) verwendet.

Tab. 3.11: Ermittelte Kopienzahlen in unabhängigen transgenen Linien von N 141 und N 145

Per Southern Blot-Analyse wurden die Kopienzahlen der T-DNA von A156 im Pappelgenom quantifiziert.

Kopienzahl der T-DNA	Transgene Linien
1	N 141-6, -7
	N 145-2, -3, -5, -7
2	N 141-1, -4
	N 145-4, -6

Phänotypisierung

Zur Analyse der Pflanzen unter naturnahen Bedingungen außerhalb der Gewebekultur wurden von jeder Sublinie von N 141 und N 145 mehrere Pflanzen zusammen mit nicht-transgenen Kontrollpflanzen ins Gewächshaus überführt und hier kultiviert. Dies fand bereits vor Beginn dieser Promotionsstudie statt, sodass kein Einfluss auf den Standort der Pflanzen möglich war. Die Kontrollpflanzen hatten einen ähnlichen, allerdings nicht den gleichen Standort wie die transgenen Pappeln. Nach Abschluss der jährlichen Vegetationsperioden wurde die Gesamthöhe der Pappeln gemessen (Tab. 3.12 und 3.13). In mehreren Fällen wurden signifikante Mittelwertabweichungen der transgenen Pflanzen im Vergleich zu den nicht-transgenen Pflanzen beobachtet. Dies war aber aufgrund der oben beschriebenen Standortabweichungen unter Vorbehalt zu bewerten. Die Pappeln zeigten auch nach sieben- (N 141) bzw. sechsjähriger (N 145) Kultivierung keine Blütenbildung.

Tab. 3.12: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linie N 141 im Gewächshaus

Die Gesamthöhen der Pappeln wurden nach Abschluss der jeweiligen Vegetationsperioden gemessen. Signifikante Mittelwertabweichungen traten in mehreren Fällen auf ($p \leq 0,05$). Aufgrund von Kultureffekten waren die Höhenmessungen nach der vierten Vegetationsperiode nicht mehr vergleichbar.

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standard-abweichung [cm]	p	Signifikanz
Eine Vegetationsperiode						
Kontrollen	8	25	25	2		
N 141-1	27	24	23	3	0,28	nein
N 141-4	14	23	23	2	0,11	nein
N 141-6	5	19	20	4	0,03	ja, signifikant kleiner
Zwei Vegetationsperioden						
Kontrollen	8	113	113	7		
N 141-1	26	95	98	16	0,00	ja, signifikant kleiner
N 141-4	11	95	106	26	0,06	ja, signifikant kleiner
N 141-6	3	67	55	31	0,17	nein
Drei Vegetationsperioden						
Kontrollen	8	163	163	21		
N 141-1	26	109	112	11	0,00	ja, signifikant kleiner
N 141-4	11	109	112	15	0,00	ja, signifikant kleiner
N 141-6	4	86	83	20	0,00	ja, signifikant kleiner

Tab. 3.12: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linie N 141 im Gewächshaus (Fortsetzung)

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standardabweichung [cm]	p	Signifikanz
Vier Vegetationsperioden						
Kontrollen	5	194	194	12		
N 141-1	22	161	164	23	0,00	ja, signifikant kleiner
N 141-4	5	178	181	7	0,07	ja, signifikant kleiner
N 141-6	4	168	169	8	0,01	ja, signifikant kleiner

Tab. 3.13: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linie N 145 im Gewächshaus

Die Gesamthöhen der Pappeln wurden nach Abschluss der jeweiligen Vegetationsperioden gemessen. Signifikante Mittelwertabweichungen traten in mehreren Fällen auf ($p \leq 0,05$). Aufgrund von Kultureffekten waren die Höhenmessungen nach der dritten Vegetationsperiode nicht mehr vergleichbar.

Sublinie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standardabweichung [cm]	p	Signifikanz
Eine Vegetationsperiode						
Kontrollen	5	35	35	4		
N 145-2	5	28	28	3	0,01	ja, signifikant kleiner
N 145-3	8	28	27	6	0,03	ja, signifikant kleiner
N 145-4	24	27	26	8	0,01	ja, signifikant kleiner
N 145-5	8	30	30	4	0,08	nein
N 145-6	16	25	23	6	0,00	ja, signifikant kleiner
N 145-7	5	23	22	3	0,00	ja, signifikant kleiner
Zwei Vegetationsperioden						
Kontrollen	5	161	156	13		
N 145-2	5	122	125	6	0,00	ja, signifikant kleiner
N 145-3	7	50	48	18	0,00	ja, signifikant kleiner
N 145-4	23	118	124	24	0,00	ja, signifikant kleiner
N 145-5	6	91	87	36	0,01	ja, signifikant kleiner
N 145-6	17	117	121	20	0,00	ja, signifikant kleiner
N 145-7	5	136	136	5	0,02	ja, signifikant kleiner
Drei Vegetationsperioden						
Kontrollen	5	202	204	14		
N 145-2	5	178	180	14	0,04	ja, signifikant kleiner
N 145-3	7	84	78	35	0,00	ja, signifikant kleiner
N 145-4	21	190	189	27	0,24	nein
N 145-5	6	162	168	39	0,07	nein
N 145-6	16	184	190	16	0,06	nein
N 145-7	5	194	173	32	0,66	nein

Die Messdaten waren nur bis zur vierten (N 141) bzw. dritten (N 145) Vegetationsperiode miteinander vergleichbar (Abb. 3.13 und 3.14). Anschließend wurde beobachtet, dass die Pappeln, insbesondere die Kontrollpflanzen, ihr Wachstum den Messdaten zufolge deutlich reduzierten oder sogar einstellten. Hinzu kamen Kultureffekte wie beispielsweise abgebrochene Sprossspitzen, wodurch das Höhenwachstum eingeschränkt war.

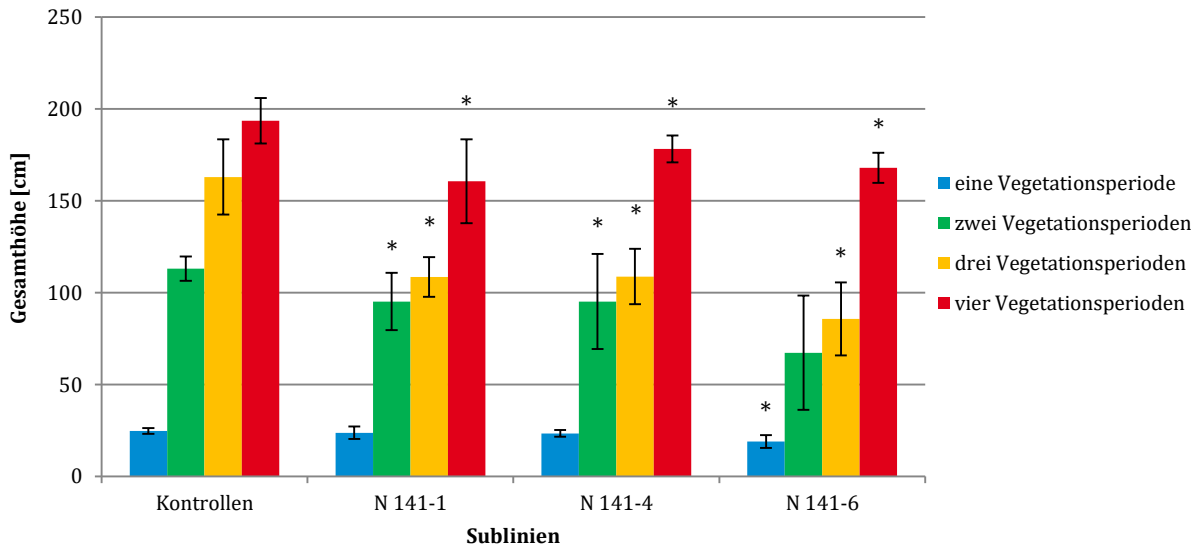


Abb. 3.13: Entwicklung der Gesamthöhe von N 141-Sublinien über die vierjährige Kulturdauer

Über den Kulturzeitraum entwickelten sich die Pappeln der drei Sublinien von N 141 einheitlich. Nach der dritten Vegetationsperiode waren alle Sublinien signifikant kleiner ($p = 0,00$, mit * markiert). Die Fehlerindikatoren markieren die Standardabweichungen der Mittelwerte.

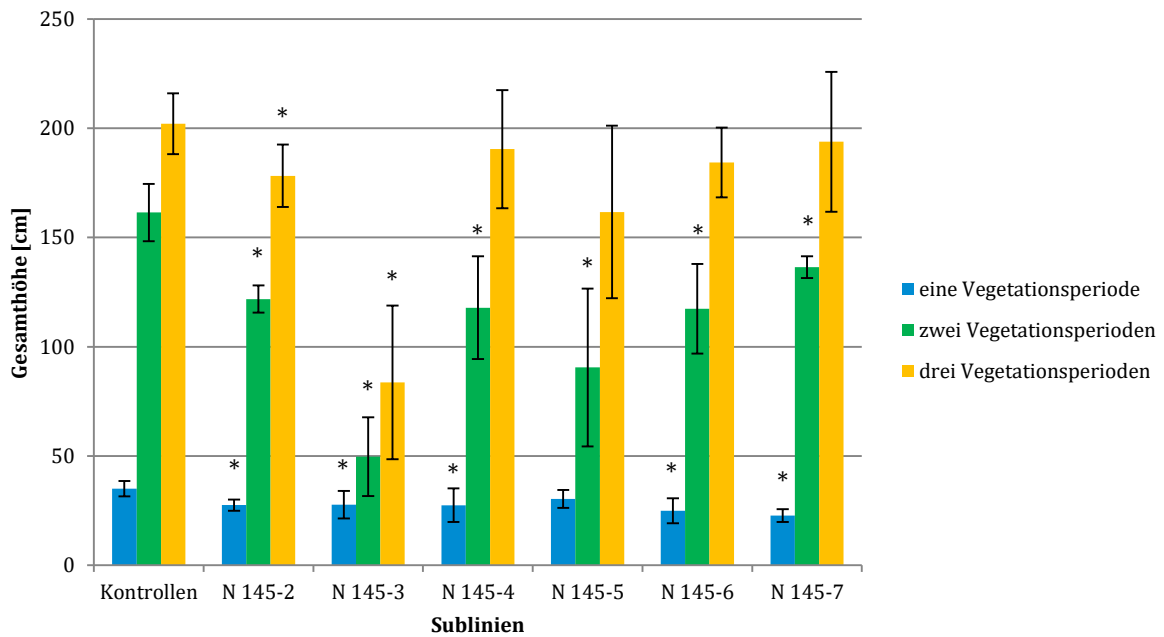


Abb. 3.14: Entwicklung der Gesamthöhe von N 145-Sublinien über die dreijährige Kulturdauer

Über den Kulturzeitraum entwickelten sich die Pappeln der Sublinien von N 145 einheitlich, lediglich N 145-3 blieb durchschnittlich etwas kleiner. Nach der zweiten Vegetationsperiode waren alle Sublinien signifikant kleiner als die nicht-transgenen Kontrollen ($p \leq 0,02$, mit * markiert). Die Fehlerindikatoren markieren die Standardabweichungen der Mittelwerte. Nach der dritten Vegetationsperiode waren die Messwerte nicht mehr vergleichbar, da Kultureffekte einen übermäßigen Einfluss auf die Messwerte hatten.

Holzchemische Analysen

Von den im Gewächshaus kultivierten Pflanzen wurden 19 ausgewählte Individuen zur biochemischen Untersuchung der Biomasse an das Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung (Potsdam, K. Hettrich) übergeben (Tab. 3.14). Für diese Pflanzen existierten keine nicht-transgenen Kontrollpflanzen,

die unter gleichen Bedingungen kultiviert wurden. Als Kontrollpflanzen wurden daher drei Esch5-Wildtypen verwendet, die über eine ähnliche Dauer kultiviert wurden.

Tab. 3.14: Zur Biomasse-Analyse ausgewählte Pappeln der Sublinien von N 145

N 145-3		N 145-4		N 145-5		N 145-6		Esch5-WT	
Pappel	Kultur	Pappel	Kultur	Pappel	Kultur	Pappel	Kultur	Pappel	Kultur
6972	50 Monate	6980	50 Monate	7006	50 Monate	7012	50 Monate	7957	47 Monate
6976	50 Monate	6989	50 Monate	7010	50 Monate	7017	50 Monate	8092	45 Monate
8022	47 Monate	6994	50 Monate	7928	47 Monate	7020	50 Monate	8291	44 Monate
8024	47 Monate	7000	50 Monate	7929	47 Monate	7024	50 Monate		
8026	47 Monate	7920	47 Monate			7027	50 Monate		

Die in Tab. 3.15 zusammengestellten Ergebnisse der holzchemischen Analysen sind unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Kulturdauer der untersuchten Pflanzen im Gewächshaus zu bewerten. In allen getesteten Sublinien waren signifikante Unterschiede in einzelnen Holzbestandteilen festzustellen. Alle Sublinien hatten einen signifikant vom Wildtyp abweichenden Anteil an Ethanol-Extraktstoffen. In den drei Sublinien N 145-4, -5 und -6 war der Unterschied mit bis zu 5,1% besonders stark und wurde hier von einem signifikant erhöhten Celluloseanteil aufgefangen. Bei der Sublinie N 145-3, die nach der dritten Vegetationsperiode signifikant kleiner war (Abb. 3.14), waren die signifikanten Abweichungen mit einem anderen Muster verteilt als bei den anderen Sublinien. Hier waren beispielsweise der Cellulose-Anteil unverändert und die Ethanol-Extraktstoffe nur um 1,8% verändert.

Tab. 3.15: Prozentuale chemische Zusammensetzung des Sprossgewebes der Linien N 145-3, N 145-4, N 145-5 und N 145-6

Die Mittelwerte M der einzelnen Bestandteile wurden aus jeweils fünf oder vier (nur N 145-4) Individuen pro transgener Sublinie berechnet. Mehrere signifikante Abweichungen ($p \leq 0,05$, markiert mit *) wurden ermittelt, allerdings auf Grundlage von nicht-transgenen Kontrollpflanzen, die nicht den selben Kulturbedingungen entstammen. Die Analysen wurden am Fraunhofer IAP durchgeführt (K. Hettrich). Abkürzungen: M - Mittelwert, s - Standardabweichung, p - Irrtumswahrscheinlichkeit für signifikante Abweichung.

Bestandteile	Transgene Pflanzen der Linie N 145												Nicht-transgene Kontrollen	
	N 145-3			N 145-4			N 145-5			N 145-6			M	s
	M	s	p	M	s	p	M	s	p	M	s	p	M	s
Asche	3,4	0,1	0,22	3,4	0,1	0,53	2,9	0,2	0,01*	3,0	0,2	0,02*	3,5	0,1
Protein	5,3	1,3	0,00*	1,9	0,3	0,21	3,2	1,3	0,12	2,7	0,6	0,02*	1,5	0,2
Ethanol-Extraktstoffe	9,8	1,1	0,03*	6,5	0,3	0,00*	6,0	0,6	0,00*	6,3	0,3	0,00*	11,6	0,1
Cellulose	30,1	2,1	0,91	34,1	0,8	0,03*	34,3	0,6	0,02*	33,9	0,6	0,03*	30,0	1,2
Hemicellulose	22,0	0,4	0,02*	23,9	0,6	0,07	23,3	0,5	0,49	23,5	0,4	0,16	23,0	0,3
Lignin	22,6	0,3	0,01*	21,5	0,2	0,03*	22,1	0,3	0,30	21,4	0,1	0,01*	21,9	0,1

Holzanatomische Untersuchungen

Am Thünen-Institut für Holzforschung wurden UMSP-Analysen von einzelnen Pappeln der Linie N 145-6 durchgeführt (Abb. 3.15). Besondere Auffälligkeiten in der Ligninverteilung oder im Gewebeaufbau, die über individuelle Schwankungen hinaus gingen, wurden nicht festgestellt.

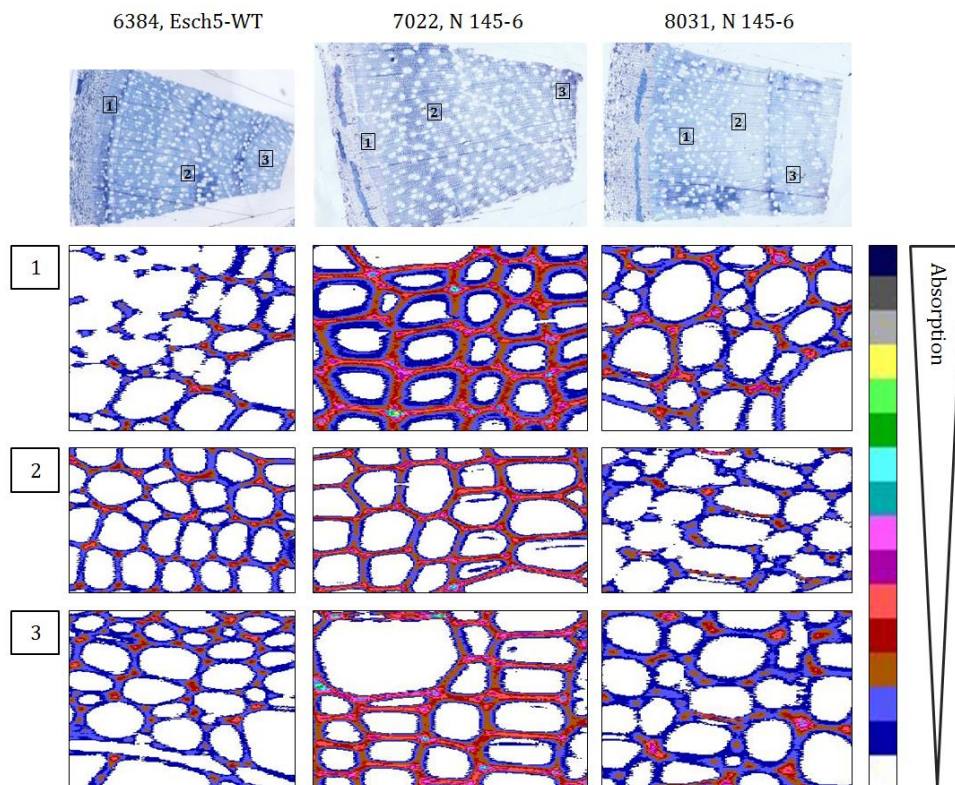


Abb. 3.15: UMS-P-Analysen von zwei Pappeln der Linie N 145-6

Die Sprossquerschnitte wurden in 10 cm Höhe gesetzt. Die Analysen der drei ausgewählten Bereiche (Ausschnitte 1-3) zeigten eine starke Ligninverteilung in der Pappel 7022. In der Pappel 8031 war etwa vergleichbar viel Lignin wie im Wildtyp von Esch5 eingelagert. Die Analysen wurden am Thünen-Institut für Holzforschung (U. Schmitt) durchgeführt.

Die parallele Herunterregulierung von *SOC1* und *FUL* ergab teilweise signifikant kleinere Pflanzen, wobei Unterschiede in der Kultivierung hierfür ursächlich sein könnten. Zudem wurde eine veränderte Holzzusammensetzung beobachtet.

3.1.3.2 Parallele Überexpression

Zur parallelen Überexpression von *AtSOC1* und *SaFUL* wurden Transformationsvektoren verwendet, die unter Kontrolle des 35S-Promoters die Zielgene konstitutiv überexprimierten. Der Transformationsvektor A122 kodierte für *AtSOC1* und die Kanamycin-Resistenz *NPTII* zur Selektion. A137 kodierte für *SaFUL* und ebenfalls die Kanamycin-Resistenz *NPTII*. Beide Transformationsvektoren wurden für die Transformation N 94 mit *P. tremula* × *P. tremuloides*-Hybrid Esch5 verwendet. Um schon bei der Regeneration nach der Transformation auf doppeltransgene Pflanzen selektieren zu können, wurde für zwei Transformationen statt A122 der Vektor A141 eingesetzt. A141 basiert auf A122, allerdings war hier der Selektionsmarker *NPTII* gegen die Hygromycinresistenz *HPT* ausgetauscht. Mit den Vektoren A137 und A141 wurden zwei Transformationen des *P. × canescens*-Klons P1 durchgeführt: N 352 und N 407.

Molekulargenetische Untersuchungen

Aus den drei durchgeführten Transformationen wurden insgesamt 14 putativ transgene Sublinien herangezogen. Per PCR und anschließender Gelelektrophorese wurde die Anwesenheit der

Selektionsmarker *NPTII* und *HPT* (Abb. 3.16) sowie der Zielgene (Abb. 3.17) nachgewiesen, um den Transformationserfolg zu überprüfen (Tab. 3.16). Exemplarisch sind im Folgenden die Ergebnisse von N 407 gezeigt. Insgesamt acht doppeltransgene Linien standen für die molekulargenetischen Analysen zur Verfügung, von denen allerdings zwei Linien im Bearbeitungsverlauf abstarben (N 352-3 und -7).

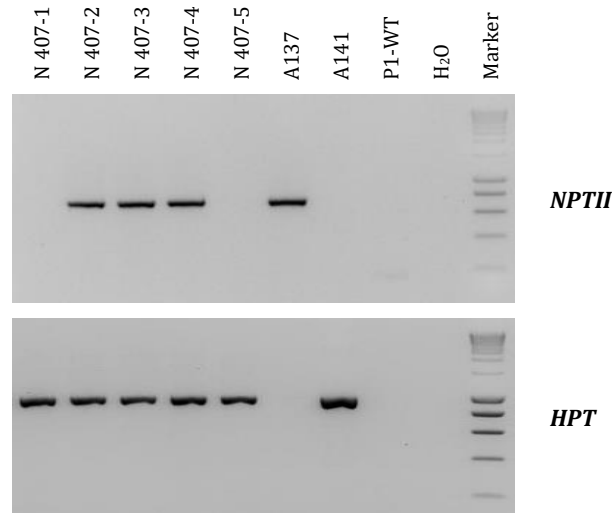


Abb. 3.16: Gelelektrophoretischer Nachweis des Selektionsmarkers *NPTII* und *HPT*

Die PCR wurde mit den Primern #343 und #344 (*NPTII*) sowie #337 und #338 (*HPT*) bei einer *Annealing*-Temperatur von 58 °C und mit 37 Amplifikationszyklen durchgeführt. 5 µL der PCR-Produkte wurden auf einem 1,5% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. Die zwei Linien N 407-1 und -5 enthielten nur die Hygromycinresistenz *HPT*, nicht die Kanamycinresistenz.

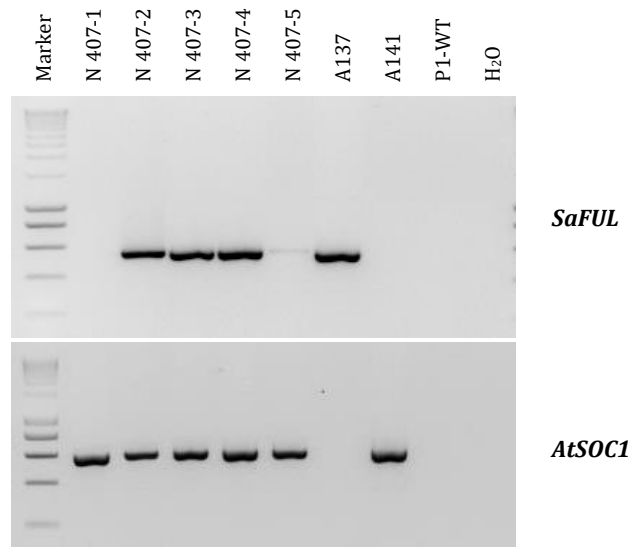


Abb. 3.17: Gelelektrophoretischer Nachweis der Zielgene *SaFUL* und *AtSOC1*

Die PCR zum Nachweis von *SaFUL* wurde mit den Primern #1847 und #1573 bei einer *Annealing*-Temperatur von 56 °C und mit 37 Amplifikationszyklen durchgeführt. Zum Nachweis von *AtSOC1* wurden die Primer #1236 und #1237 bei einer *Annealing*-Temperatur von 53 °C und mit 40 Amplifikationszyklen verwendet. 5 µL des Ansatzes wurden auf einem 1,3% (*SaFUL*) bzw. 1,5% (*AtSOC1*) Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. Die Ergebnisse der PCRs zum Nachweis der Resistenzmarker konnten bestätigt werden: *SaFUL* wurde in N 407-2, -3 und -4 nachgewiesen, *AtSOC1* in allen fünf Sublinien von N 407.

Tab. 3.16: Nachweis des Transformationserfolgs zur Überexpression von *AtSOC1* und *SaFUL*

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit waren nur noch zwei Sublinien der Transformation N 94, nämlich N 94-5 und N 94-6 vorhanden. Die doppeltransgenen Linien N 352-3 und N 352-7 starben im weiteren Bearbeitungsverlauf ab, sodass nur die eine doppeltransgene Linie N 352-2 zurückblieb.

Linie	Putativ doppeltransgene Regenerate	Sublinien mit nachgewiesenen Selektionsmarkern	Sublinien mit nachgewiesenen Zielgenen
N 94	2	2	2
N 352	7	7	3 (+4 mit nur einem Zielgen)
N 407	5	4 (+1 mit nur einem Selektionsmarker)	3 (+2 mit nur einem Zielgen)

Mit Hilfe von Southern Blots wurde die Kopienzahlen ermittelt, mit der die T-DNAs von A137 und A122 bzw. A141 ins Genom der einzelnen Sublinien integriert wurden. Zum Nachweis wurden Sonden verwendet, die entweder mit der Sequenz der Zielgene oder der Selektionsmarker hybridisierten, wie beispielhaft für N 407 gezeigt (Abb. 3.18). Die ermittelten Kopienzahlen sind in Tab. 3.17 zusammengefasst.

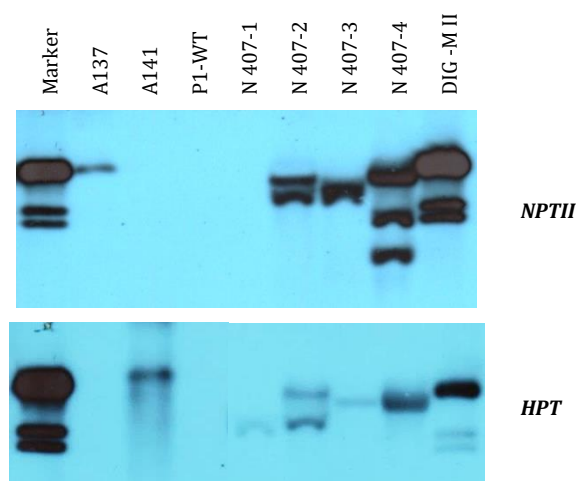


Abb. 3.18: Southern Blot zur Quantifizierung der Kopienanzahl in N 407

Die DNA für dieses Southern Blot wurde mit *Afl*III restringiert. Zunächst wurde die Membran mit der Digoxigenin-markierten Sonde für *HPT* hybridisiert, anschließend einem Stripping unterzogen und mit der Sonde für *NPTII* hybridisiert. Als Fragmentlängenmarker wurde der DIG-Marker II (Fa. Roche, Mannheim) verwendet. Die drei Kontrollen des mit der Sonde für *HPT* hybridisierten Blots werden hier mit einem stärker exponierten Film abgebildet.

Tab. 3.17: Ermittelte Kopienzahlen in unabhängigen transgenen Linien von N 94, N 352 und N 407

Per Southern Blot-Analyse wurden die Kopienzahlen der T-DNA von A137 und A122 bzw. A141 im Pappelgenom quantifiziert. Berücksichtigt wurden lediglich Linien, deren doppeltransgener Status zuvor per PCR bestätigt wurde.

T-DNA-Kopien	1 × <i>SaFUL</i>	2 × <i>SaFUL</i>	3 × <i>SaFUL</i>
1 × <i>AtSOC1</i>	N 94-5, N 94-6	N 407-3	N 407-4
2 × <i>AtSOC1</i>		N 407-2	
3 × <i>AtSOC1</i>	N 352-2		

Die Expression von *AtSOC1* und *SaFUL* in den doppeltransgenen Linien von N 94, N 352 und N 407 wurde mit den Primern #1845 und #1237 für *AtSOC1*, #1846 und #1848 für *SaFUL* sowie #1238 und #1237 für den Test auf Anwesenheit von genomischer DNA in einer semiquantitativen RT-PCR überprüft. Als

Template für die PCRs diente 200 ng cDNA, die aus der RNA von Blättern gewonnen wurde. Die Pflanzen hierfür wurden im Gewächshaus kultiviert. Sowohl in den Pappeln der Linie N 94-5 als auch N 94-6 wurde die Expression von *AtSOC1* und *SaFUL* bestätigt (Abb. 3.19).

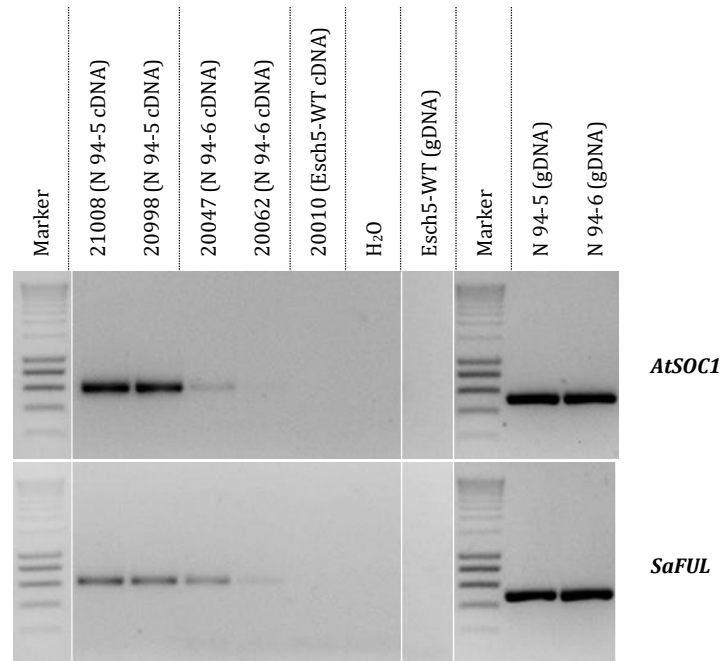


Abb. 3.19: Semiquantitative RT-PCR von *AtSOC1* und *SaFUL* in den transgenen Linien von N 94

Die PCRs wurden mit den Primerpaaren #1845 und #1237 (*AtSOC1*) sowie #1846 und #1848 (*SaFUL*) bei einer *Annealing*-Temperatur von 55 °C (*AtSOC1*) bzw. 59 °C (*SaFUL*) und mit 40 Amplifikationszyklen durchgeführt. Für Elektrophorese wurde ein 1,3% Agarose-TBE-Gel verwendet. In beiden Sublinien N 94-5 (Individuen 21008 und 20998) und -6 (Individuen 20062 und 20010) wurde die parallele, transgene Expression von *AtSOC1* und *SaFUL* nachgewiesen. Kontaminationen mit gDNA waren nicht feststellbar (ohne Abbildung).

Die Expressionsanalyse von jeweils zwei Klonen der Linien N 352-1, -2, -4, -5 und -6 ergab, dass lediglich in den Klonen der Linie N 352-2 beide Transgene exprimiert wurden (Abb. 3.20). In den Linien N 352-4, -5 und -6 wurde die transgene Expression von *AtSOC1* nachgewiesen. In N 352-1 wurde kein Transgen exprimiert.

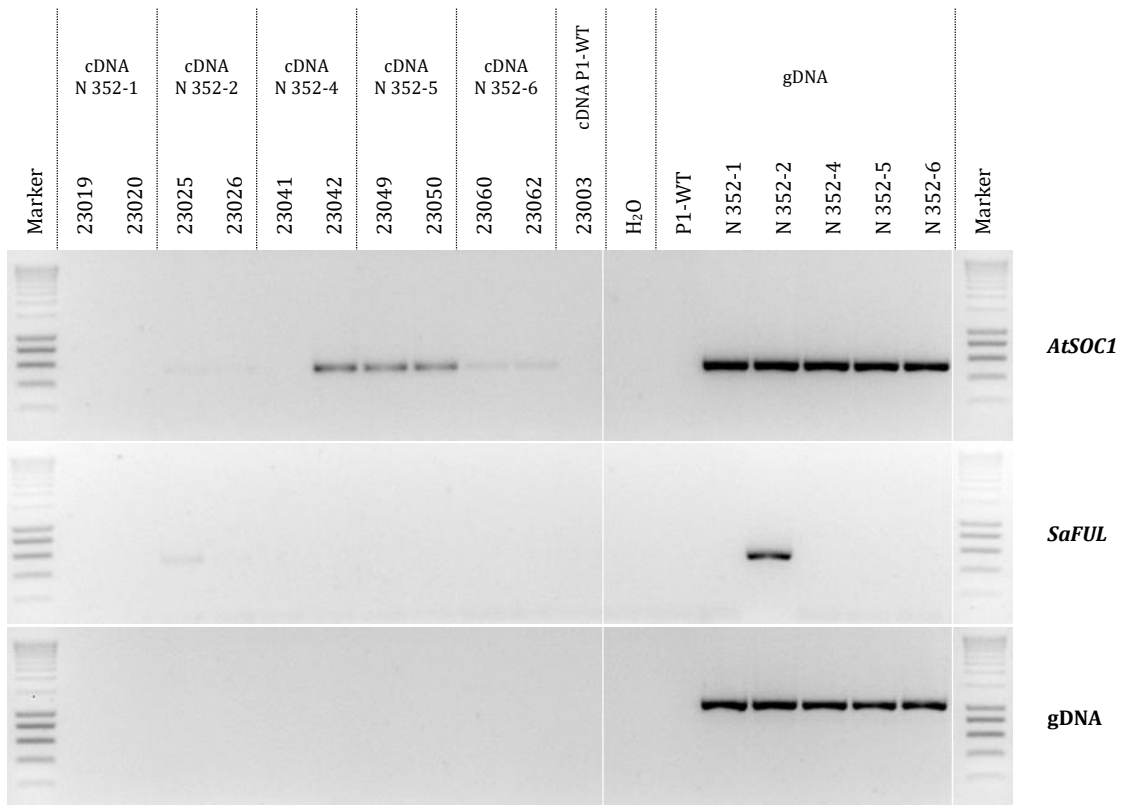


Abb. 3.20: Semiquantitative RT-PCR von *AtSOC1* und *SaFUL* in den transgenen Linien von N 352

Die PCRs wurden mit den Primerpaaren #1845 und #1237 (*AtSOC1*) sowie #1846 und #1848 (*SaFUL*) bei *Annealing*-Temperaturen von 55 °C (*AtSOC1*) bzw. 59 °C (*SaFUL*) und mit 40 Amplifikationszyklen durchgeführt. Für die Elektrophorese wurde ein 1,3% Agarose-TBE-Gel verwendet. In der Sublinie N 352-2 wurde die parallele, transgene Expression von *AtSOC1* und *SaFUL* nachgewiesen. In N 407-4, -5 und -6 wurde nur *AtSOC1* exprimiert. In beiden Klonen von N 352-1 wurde keine transgene Expression detektiert. Zur Kontrolle auf vollständigen gDNA-Abbau wurden alle Proben mit dem Primerpaar #1238 und #1237 auf Anwesenheit von transgener gDNA getestet. Primer #1238 bindet im 35S-Promoter und war daher nur in gDNA zur Amplifikation verwendbar. Die entsprechende PCR wurde bei einer *Annealing*-Temperatur von 55 °C und mit 40 Amplifikationszyklen durchgeführt.

Ergebnis der semiquantitativen RT-PCR war, dass sowohl *AtSOC1* als auch *SaFUL* in N 407-2, N 407-3 und N 407-4 exprimiert wurden, in N 407-1 lediglich *AtSOC1* (Abb. 3.21 und 3.22). Dieses Ergebnis entsprach den vorherigen PCR-Analysen zur Überprüfung des Transformationserfolgs.

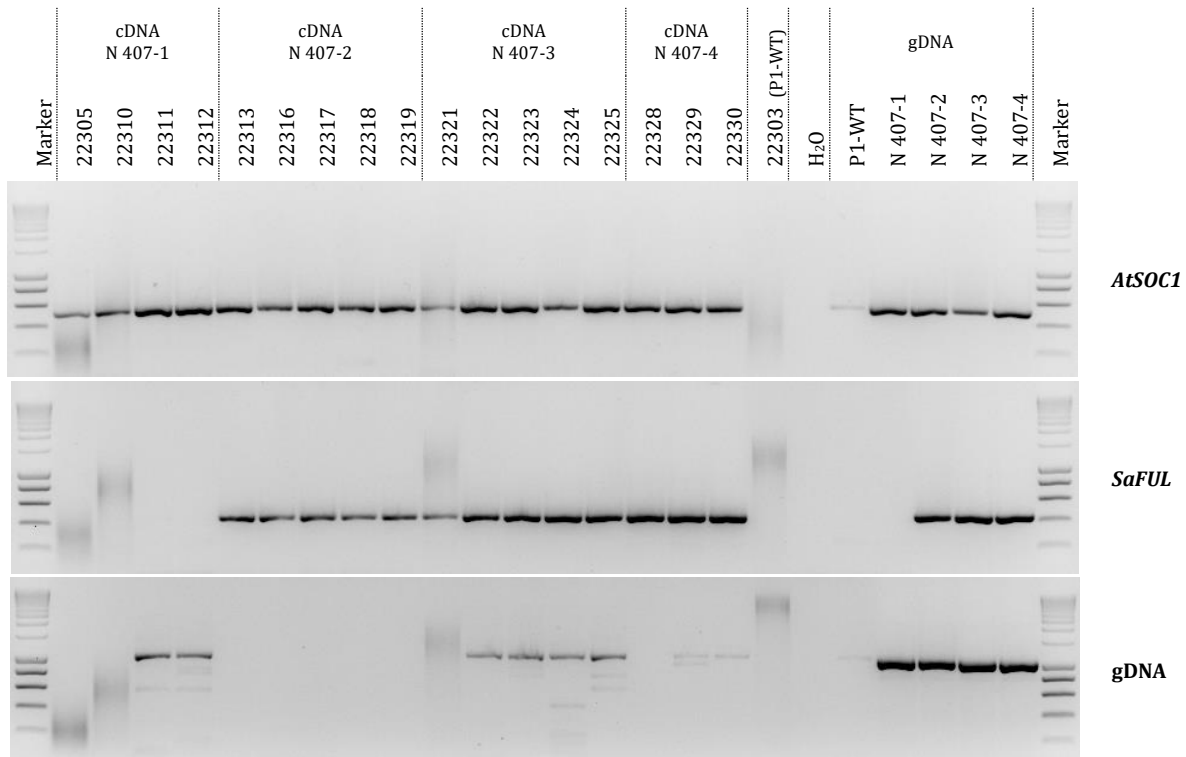


Abb. 3.21: Semiquantitative RT-PCR von *AtSOC1* und *SaFUL* in den transgenen Pappeln von N 407

Die PCRs wurden mit jeweils 200 ng cDNA bzw. gDNA bei einer *Annealing*-Temperatur von 50 °C und 40 Amplifikationszyklen durchgeführt. Als Primerpaare wurden #1845 und #1237 (*AtSOC1*) sowie #1846 und #1848 (*SaFUL*) verwendet. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,5% Agarose-TBE-Elektrophoresegel aufgetrennt. *AtSOC1* wurde in allen getesteten Pappeln exprimiert, *SaFUL* nur in den Pappeln der Linien N 407-2, -3 und -4. In den Sublinien N 407-3 und N 407-4 wurde die parallele, transgene Expression von *AtSOC1* und *SaFUL* nachgewiesen. Zur Kontrolle auf vollständigen gDNA-Abbau wurden alle Proben mit dem Primerpaar #1238 (bindet im 35S-Promoter) und #1237 auf Anwesenheit von transgener gDNA getestet. In einigen Proben der Linien N 407-1, N 407-3 und N 407-4 wurden auf diesem Weg gDNA-Kontaminationen nachgewiesen.

Aufgrund von gDNA-Kontaminationen in den vorherigen PCR-Ergebnissen wurde mit einigen Individuen die Expressionsuntersuchung noch einmal wiederholt (Abb. 3.22). Hierzu wurde die extrahierte Gesamt-RNA erneut dem DNase-Verdau unterzogen, um anschließend die Reverse Transkription durchzuführen. Die Wiederholung mit dieser neuen cDNA bestätigte die vorangegangene Expressionsuntersuchung in sofern, dass *AtSOC1* in den transgenen Linien N 407-1, -2, -3 und -4 exprimiert wurde, *SaFUL* in den Linien N 407-2, -3 und -4.

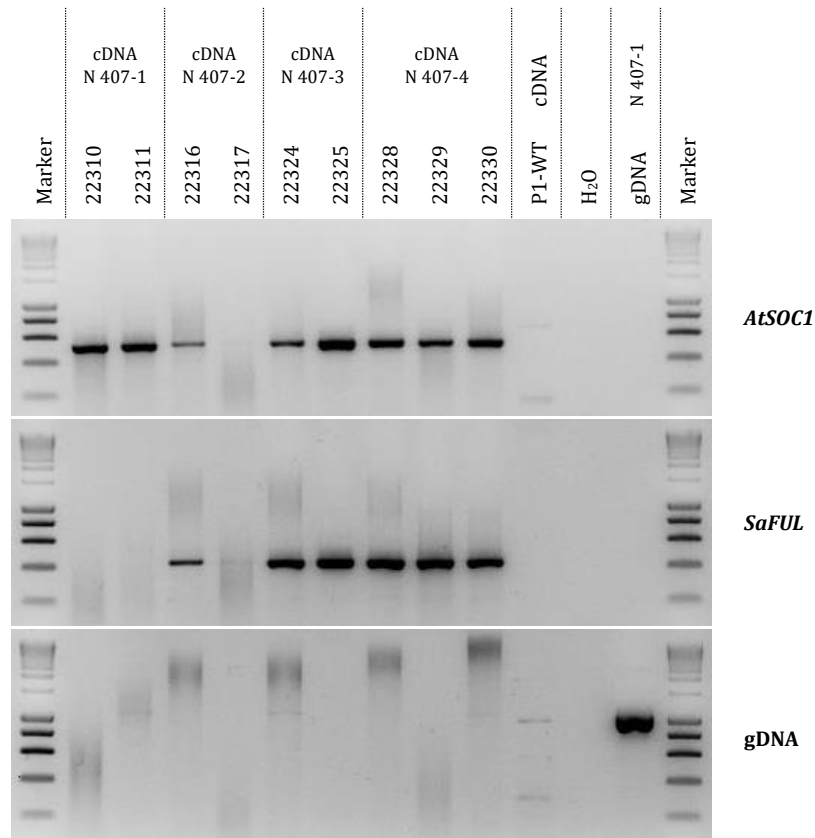


Abb. 3.22: Semiquantitative RT-PCR von *AtSOC1* und *SaFUL* in den transgenen Linien von N 407

Die PCRs wurden mit den Primerpaaren #1845 und #1237 (*AtSOC1*) sowie #1846 und #1848 (*SaFUL*) bei einer *Annealing*-Temperatur von 50 °C und mit 40 Amplifikationszyklen durchgeführt. Die Elektrophorese wurde mit einem 1,5% Agarose-TBE-Gel durchgeführt. In den Sublinien N 407-2, -3 und -4 wurde die parallele, transgene Expression von *AtSOC1* und *SaFUL* nachgewiesen. In N 407-1 wurde nur *AtSOC1* exprimiert. In N 407-2 fiel ein Klon ohne PCR-Ergebnis aus. Zur Kontrolle, ob die gewählten Primerpaare für die spezifisch für die RNAs der beiden Transgene waren, wurden die PCRs auch mit genomischer DNA von N 407-1 durchgeführt, die negativ waren. Zur Kontrolle auf vollständigen gDNA-Abbau wurden alle Proben mit dem Primerpaar #1238 (bindet im 35S-Promoter) und #1237 auf Anwesenheit von transgener gDNA getestet.

Zur Ermittlung der T-DNA-Integrationsorte und zur Prüfung von möglichen Positionseffekten wurden TAIL-PCRs mit 128-fach bzw. 256-fach degenerierten Primern durchgeführt. Die spezifischen Primer wurden für N 94 und N 407 derart gestaltet, dass der Integrationsort von A122 über die *Left Border* hinaus amplifiziert wurde und der von A141 über die *Right Border*. Dementsprechend wurde zur Bestimmung des Integrationsortes von A137 die *Right Border* oder *Left Border* verwendet. Die genomischen Bereiche außerhalb der T-DNA wurden mit einer *BLAST*-Analyse in *P. trichocarpa* und *P. × canescens* (<https://phytozome.jgi.doe.gov>, <http://aspendb.uga.edu/spta717/Blast>, Zugriff am 27.04.2016) detektiert. Die identifizierten Bereiche sind in Tab. 3.18 zusammengefasst. In den Linien N 407-1, -2 und -3 konnten die Integrationsorte auch nach mehrfachen Versuchen nicht vollständig bestimmt werden.

Tab. 3.18: Integrationsorte der transgenen Linien zur parallelen Überexpression von *SOC1* und *FUL*

Die Integrationsorte wurden durch eine *BLAST*-Analyse in den Datenbanksequenzen von *P. trichocarpa* (*Pt*, Version 3.0) und *P. × canescens* (*Pc*, Version 1.1) ermittelt. Die Angaben zu den funktionellen Annotierungen der Loci basieren auf *P. trichocarpa*. Farblich hinterlegt sind die Linien mit signifikant abweichender Gesamthöhe. Abkürzungen: LB - *Left Border*, RB - *Right Border*.

Sublinie	T-DNA / Border	Integrationsort	Datenbank-Art	Score <i>Pt (Pc)</i>	E-Wert <i>Pt (Pc)</i>	Funktionelle Annotierung des Integrationslocus
N 94-5	A122 / LB	Chromosom 11	<i>Pt, Pc</i>	318,7 (244)	1,1E-85 (2E-63)	Potri.011G038500 (Intron)
		Chromosom 19	<i>Pt, Pc</i>	210,5 (237)	6E-53 (4E-61)	ohne funktionelle Annotierung
	A137 / RB	Chromosom 5	<i>Pt, Pc</i>	217,7 (241)	3E-55 (3E-62)	Potri.005G172700 (Exon)
N 94-6	A122 / LB	Chromosom 19	<i>Pt, Pc</i>	210,5 (237)	7,9E-53 (6E-61)	ohne funktionelle Annotierung
		Chromosom 17	<i>Pt</i>	59,0	2,1E-8	ohne funktionelle Annotierung
	A137 / RB	Chromosom 19	<i>Pt</i>	96,9	1,5E-19	ohne funktionelle Annotierung
N 407-1	A141 / RB	Chromosom 3	<i>Pt, Pc</i>	625,3 (689)	9,2E-178 (0,0)	ohne funktionelle Annotierung
N 407-3	A137 / LB	Chromosom 2	<i>Pt, Pc</i>	161,8 (154)	8,5E-39 (1E-36)	Potri.002G104900 (Intron)
N 407-4	A137 / LB	Chromosom 14	<i>Pt, Pc</i>	558,5 (604)	2,3E-157 (2E-171)	Potri.014G103000 (3' UTR)

Das Gen Potri.011G038500 war als Proteinkinase annotiert. Der EC-Code 2.7.11.1 stand für eine unspezifische Serin-Threonin-Proteinkinase (<https://phytozome.jgi.doe.gov>, Zugriff am 27.04.16).

Für die Gene Potri.005G172700 und Potri.002G104900 lagen keine funktionellen Annotationen oder Domänen vor (<https://phytozome.jgi.doe.gov>, Zugriff am 27.04.16).

Das Gen Potri.014G103000 wies Sequenz-Ähnlichkeiten zum Homöobox Leucin-Zipper Protein von *Prunus armeniaca* auf (<https://phytozome.jgi.doe.gov>, Zugriff am 27.04.16). Diese Funktion wurde auch durch die PFAM-Datenbank bestätigt, die eine Homöobox-Domäne und einen *Homeobox-associated Leucin-Zipper* identifizierten. Im Protein fanden sich DNA-bindende Domänen. Es sollte als Transkriptionsfaktor eine regulatorische Funktion haben (<http://ebi.ac.uk/QuickGO>, http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?K09338, <https://phytozome.jgi.doe.gov>, Zugriffe am 27.04.16).

Durch die TAIL-PCR wurden keine Integrationsorte identifiziert, wodurch die auffälligen Phänotypen auf einen Positionseffekt zurückgeführt werden könnten.

Phänotypisierung

Bereits in der Gewebekultur waren die Pflanzen mit der parallelen Überexpression von *SOC1* und *FUL* auffällig. Bei Überführung der Pflanzen von N 94 auf 460-Medium starben die Explantate zu großem Teil ab. Sie wurden deshalb kontinuierlich auf 601_{1/4}-Medium kultiviert, wo die Explantate allerdings aufgrund des Thidiazurongehalts keine Wurzeln ausbildeten (Abb. 3.23). Zur Vorbereitung der Überführung in Erde wurden die Pflanzen auf 459-Medium umgesetzt, das NAA enthielt und dadurch zur Wurzelbildung anregte.

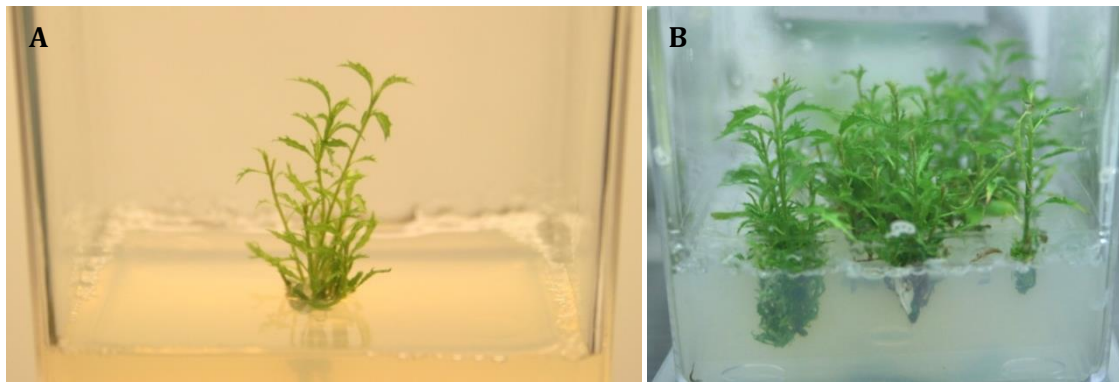


Abb. 3.23: N 94-5 in der Gewebekultur nach zwei Monaten

Die Pflanzen der Sublinie N 94-5 wurden stets auf dem Thidiazuron-haltigem Medium 601_{1/4} kultiviert. Deutlich zu erkennen waren die multiple Sprossung und gezähnten Blätter (A) sowie das Fehlen von Wurzeln (B).

Die Regenerate der Linie N 407 waren ebenfalls unverhältnismäßig schwierig zu kultivieren. Die Pflanzen wurden zur Erhaltung auf Cytokinin-haltiges Medium 601 transferiert (Abb. 3.24), nachdem sie auf 460-Medium größtenteils abgestorben waren.



Abb. 3.24: Exemplarische Abbildung von Explantaten der Linie N 407 zur Erhaltung in Petrischalen mit 601-Medium

Zur Analyse der Pflanzen unter naturnahen Bedingungen außerhalb der Gewebekultur wurden zahlreiche Pflanzen von N 94, N 352 und N 407 zusammen mit nicht-transgenen Kontrollpflanzen ins Gewächshaus überführt. Schon während der ersten Monate konnte das vom Wildtyp abweichende Höhenwachstum beobachtet werden, wie am Beispiel von N 94-6 in Abb. 3.25 dargestellt.



Abb. 3.25: Doppeltransgene Pflanzen der Linie N 94-6 nach einem (a) und zwei (b) Monaten in Erde

Abgebildet sind jeweils links eine gleichalte, nicht-transgene Kontrollpflanze Esch5 (WT) und rechts die transgene Pflanze (35S::SOC1/FUL). Bereits nach einem Monat war eine Wachstumsretardation in der Linie N 94-6 zu beobachten. Die Pflanzen wurden in einer Klimakammer unter gleichen Bedingungen kultiviert.

Die Pappeln der Linie N 94-5 wurden nach sieben- bzw. 20-monatiger Kultivierung im Gewächshaus vermessen. Sie erreichten in beiden Messungen nicht die mittlere Höhe der nicht-transgenen Kontrollpflanzen von Esch5. Die transgenen Pflanzen wurden in den ersten sieben Monaten durchschnittlich 21 cm groß (Standardabweichung ±10 cm), während die Esch5-Kontrollpflanzen im gleichen Zeitraum eine Höhe von 37 cm erreichten (Standardabweichung ±5 cm). Die transgenen Pflanzen sind daher signifikant kleiner ($p = 0,00$, Tab. 3.19). Die signifikante Abweichung der Höhe wurde auch nach der zweiten Vegetationsperiode beobachtet ($p = 0,00$, Abb. 3.26).

Die Sublinie N 94-6 blieb ebenfalls hinter dem Wachstum der nicht-transgenen Kontrollpflanzen zurück. Nach dreimonatiger Kultivierung erreichten die transgenen Pappeln eine durchschnittliche Höhe von 15 cm (Standardabweichung ±6 cm), während die nicht-transgenen Kontrollpflanzen eine Höhe von durchschnittlich 41 cm (Standardabweichung ±4 cm) erreichten. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p = 0,00$ wurden die transgenen Pflanzen als signifikant kleiner identifiziert (Tab. 3.19). Auch bei der zweiten Höhenmessung nach 15-monatiger Kultivierung im Gewächshaus waren die Pappeln von N 94-6 signifikant kleiner ($p = 0,00$) als die entsprechenden Kontrollpflanzen (Abb. 3.26).

Tab. 3.19: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linien N 94-5 und N 94-6 im Gewächshaus
Die Gesamthöhen der Pappeln wurden nach sieben- und 20- bzw. drei- und 15-monatiger Kultivierung erhoben. Beide transgenen Linien waren sowohl nach der ersten als auch nach der zweiten Vegetationsperiode signifikant kleiner ($p = 0,00$).

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standardabweichung [cm]	P	Signifikanz
7 Monate Kultur, eine Vegetationsperiode						
Kontrollen	5	37	36	5		
N 94-5	25	21	23	10	0,00	ja, signifikant kleiner
20 Monaten Kultur, zwei Vegetationsperioden						
Kontrollen	4	158	161	16		
N 94-5	15	28	27	10	0,00	ja, signifikant kleiner

Tab. 3.19: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linien N 94-5 und N 94-6 im Gewächshaus (Fortsetzung)

3 Monate Kultur, eine Vegetationsperiode						
Kontrollen	3	41	40	4		
N 94-6	10	15	17	6	0,00	ja, signifikant kleiner
15 Monate Kultur, zwei Vegetationsperioden						
Kontrollen	3	131	130	10		
N 94-6	10	73	72	10	0,00	ja, signifikant kleiner

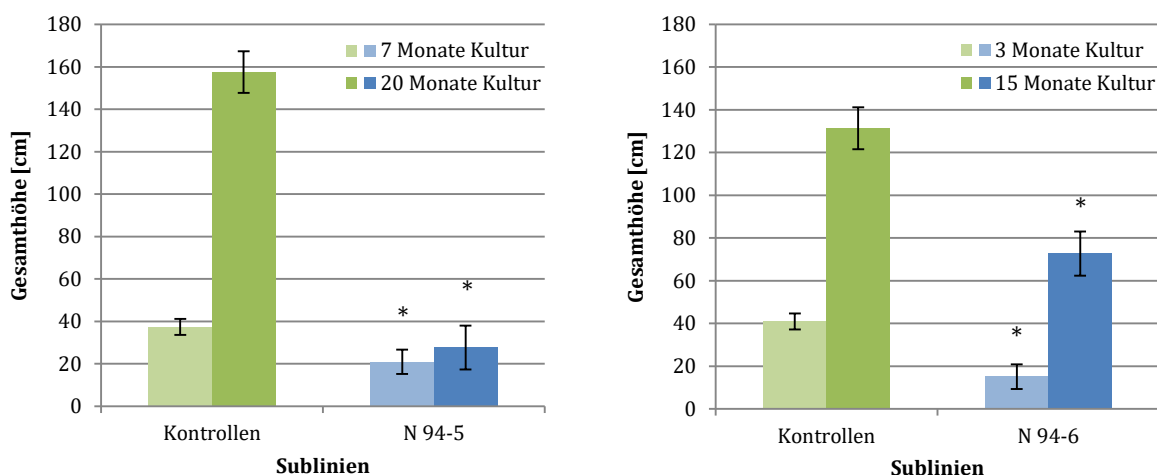


Abb. 3.26: Mittelwertvergleich der Gesamthöhenmessungen von N 94

Die Messdaten wurden nach einer bzw. zwei Vegetationsperioden in Gewächshauskultur erhoben. Bereits bei der ersten Höhenmessung wurden beide Sublinien N 94-5 und N 94-6 als signifikant kleiner identifiziert ($p = 0,00$). Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an.

Zur Dokumentierung wurden weitere Pappeln der Linien N 94-5 und -6 sowie nicht-transgene Kontrollpflanzen des Klons Esch5 ins Gewächshaus überführt. Nach 14-monatiger Kultivierung stand nur noch eine Kontrollpflanze zur Verfügung, die allerdings 62 cm größer war als die mittlere Höhe der Pappeln von N 94-5 und 45 cm größer als die mittlere Höhe der Pappeln von N 94-6 (Tab. 3.20). Aufgrund mangelnder Kontrollpflanzen konnte die Signifikanz nicht berechnet werden. Der Größenvergleich der transgenen Pappeln mit ihrer nicht-transgenen Kontrollpflanze ist in Abb. 3.27 dargestellt.

Tab. 3.20: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linien N 94-5 und N 94-6 im Gewächshaus

Die Gesamthöhen der Pappeln wurden nach 14-monatiger Kultivierung (eine Vegetationsperiode) erhoben. Eine signifikante Mittelwertabweichung wurde bei $p \leq 0,05$ angenommen. Die Signifikanz der Pflanzen, die für 14 Monate kultiviert wurden, konnte nicht berechnet werden, da lediglich eine Kontrollpflanze verfügbar war.

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standardabweichung [cm]	P	Signifikanz
Kontrolle	1	94	94	0		
N 94-5	14	32	26	18	-	nicht berechnet
N 94-6	39	49	49	11	-	nicht berechnet

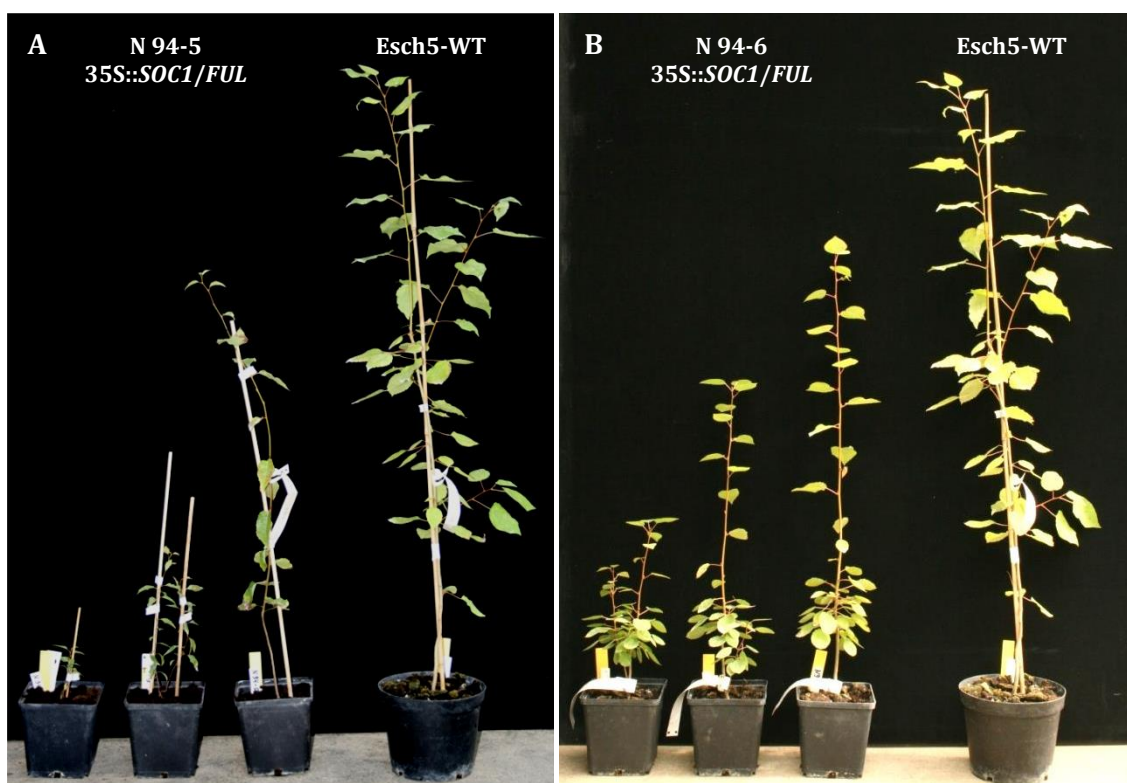


Abb. 3.27: Größenvergleich der Linie N 94-5 und N 94-6 im Gewächshaus

A) Abgebildet sind die zweitkleinste, die mediane und die größte Pflanze der Linie N 94-5 im Vergleich zum Wildtyp Esch5. Alle Pflanzen wurden für 14 Monate im Gewächshaus kultiviert. Die zweitkleinste Pflanze wurde für die Aufnahme ausgewählt, da die kleinste Pflanze mit einer Höhe von 4 cm nicht zu erkennen gewesen wäre.

B) Abgebildet sind die kleinste, die mediane und die größte Pflanze der Linie N 94-6 im Vergleich zum Wildtyp Esch5. Während eine Wildtyp-Pflanze Esch5 in 14 Monaten eine Höhe von 94 cm erreichte, lag der Höhen-Median der Linie N 94-6 bei 49 cm. Die kleinste transgene Pflanze lag nur bei 28 cm, die größte gerade einmal bei 69 cm.

Nach 26 und 44 Wochen wurde die Gesamthöhe der Pappeln von N 352 gemessen, wobei das Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ nicht erreicht wurde. Allerdings war in der einzigen doppeltransgenen Sublinie N 352-2 eine Tendenz erkennbar, dass diese Pappeln mit $p = 0,09$ bzw. $p = 0,11$ kleiner waren als die nicht-transgenen Kontrollpflanzen (Tab. 3.21, Abb. 3.28).

Tab. 3.21: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linie N 352 im Gewächshaus

Die Gesamthöhen der Pappeln wurden nach 26- und 44-wöchiger Kultivierung erhoben. Signifikante Mittelwertabweichungen ($p \leq 0,05$) zwischen den nicht-transgenen Kontrollen und transgenen Pappeln wurden nicht beobachtet.

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standardabweichung [cm]	p	Signifikanz
26 Wochen Kultur (6 Monate)						
Kontrollen	12	106	107	8		
N 352-2	4	78	79	20	0,09	nein
44 Wochen Kultur (10 Monate)						
Kontrollen	12	212	213	5		
N 352-2	4	186	180	20	0,11	nein

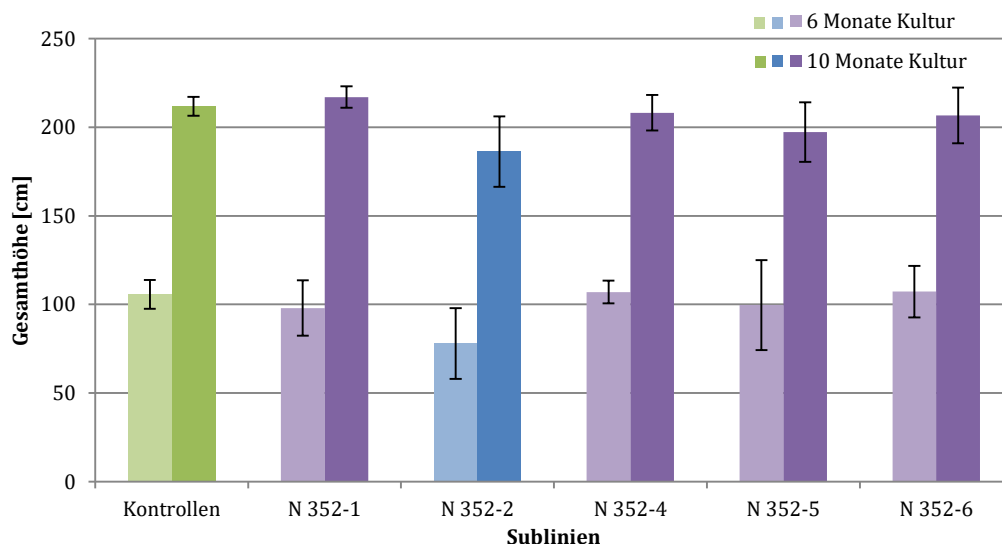


Abb. 3.28: Mittelwertvergleich der Gesamthöhenmessungen von N 352

Die Messdaten wurden nach sechs- und zehnmonatiger Kultivierung erhoben. Signifikant abweichende Linien ($p \leq 0,05$) wurden nicht ermittelt. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an.

Nach 20 Wochen wurde die Gesamthöhe der Pappeln von N 407 gemessen. N 407-3 ($p = 0,01$) und N 407-4 ($p = 0,00$) waren signifikant kleiner als die nicht-transgenen Kontrollpflanzen (Tab. 3.22, Abb. 3.29 und 3.30).

Tab. 3.22: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linie N 407 im Gewächshaus

Die Gesamthöhen der Pappeln wurden nach 20 Wochen Kultivierung erhoben. Signifikante Mittelwertabweichungen ($p \leq 0,05$) wurden in N 407-3 und N 407-4 beobachtet.

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standardabweichung [cm]	p	Signifikanz
Kontrollen	7	202	214	26		
N 407-1	4	207	207	5	0,66	nein
N 407-2	5	204	211	33	0,94	nein
N 407-3	5	140	124	32	0,01	ja, signifikant kleiner
N 407-4	3	53	63	20	0,00	ja, signifikant kleiner

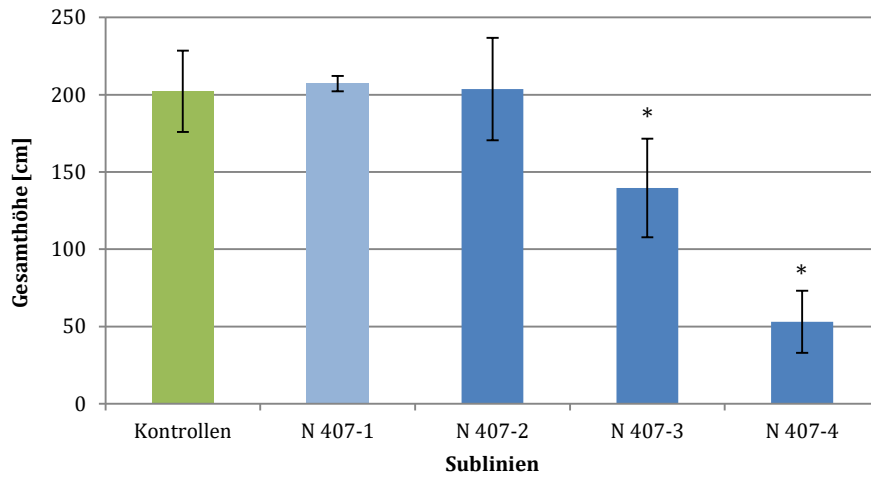


Abb. 3.29: Mittelwertvergleich der Gesamthöhenmessungen von N 407

Nach 20-wöchiger Kultivierung wichen die Mittelwerte von N 407-3 und N 407-4 signifikant von den Mittelwerten der nicht-transgenen Kontrollpflanzen ab ($p < 0,05$, markiert mit *). Diese transgenen Pflanzen sind im Durchschnitt kleiner als die Kontrollen. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an. Die einfach-transgene Linie N 407-1, in der nur *AtSOC1* vorlag, wurde hellblau abgesetzt.



Abb. 3.30: Phänotypen N 407-3 und N 407-4 im Vergleich zum Wildtyp

A) Die Pflanzen der Linie N 407-3 waren nach 25 Wochen Kultivierung im Durchschnitt signifikant kleiner als die nicht-transgenen Kontrollpflanzen ($p = 0,01$). Als Kontrollpflanze wurde aus sieben Individuen die Pflanze mit der größten Annäherung an den berechneten Mittelwert ausgewählt. B) Die drei transgenen Pappeln der Linie N 407-4 waren nach 25 Wochen Kultivierung signifikant kleiner als die nicht-transgenen Kontrollpflanzen des Klons P1 ($p = 0,00$). Als Kontrollpflanze wurde aus sieben Individuen die Pflanze mit der größten Annäherung an den berechneten Mittelwert ausgewählt. C) Nahaufnahme der drei Individuen von N 407-4.

In der Pappellinie N 407-2 wurden ebenfalls *AtSOC1* und *SaFUL* überexprimiert, allerdings wichen diese Pappeln nicht signifikant von den Wildtypen ab (Abb. 3.31).



Abb. 3.31: Vergleich der Pflanzen von N 407-2 zu den nicht-transgenen Kontrollpflanzen

Die Pflanzen der Linie N 407-2 unterschieden sich nach 25 Wochen Kultivierung nicht signifikant von den nicht-transgenen Kontrollpflanzen ($p = 0,94$). Abgebildet sind von links nach rechts die kleinste, die mediane und die größte Pappel sowie die mediane Kontrollpflanze.

Die Untersuchung der Pflanzenmorphologie offenbarte starke Phänotyp-Veränderungen in N 94-5. Diese Linie war neben ihrem kleinbleibenden Wuchs durch fragiles Wurzelwachstum und schmale, gezähnte Blätter charakterisiert. Die Biomassebildung war deutlich reduziert. Mehrere Pflanzen zeigten Neuaustriebe aus dem Wurzelstock, auch wenn der Haupttrieb noch lebendig war (Abb. 3.32), was bei den nicht-transgenen Wildtypen nicht vorkam.



Abb. 3.32: Auffällige Pflanzenmorphologie von N 94-5

A) Eine 26 Monate alte Pflanze von N 94-5 zeigte einen stark beeinflussten Phänotyp. Die Linie war kleinbleibend und bildete Nebentriebe aus dem Wurzelstock aus, auch wenn der Haupttrieb noch lebendig war. B) Die Blätter der Sublinie N 94-5 waren stark beeinträchtigt. Sie wiesen einen abweichenden, aber nicht einheitlichen, Umriss auf und waren deutlich gezähnt.

Holzanatomische Untersuchungen

Von zwei Individuen der Linie N 94-5, die für 49 Monaten im Gewächshaus kultiviert wurden, wurden am Thünen-Institut für Holzforschung lichtmikroskopische Sprossquerschnitte angefertigt (Abb. 3.33 und 3.34) und UMSP-Analysen durchgeführt (Abb. 3.36). Besondere Auffälligkeiten, die über individuelle Variabilitäten hinausgehen, wurden nicht beobachtet.

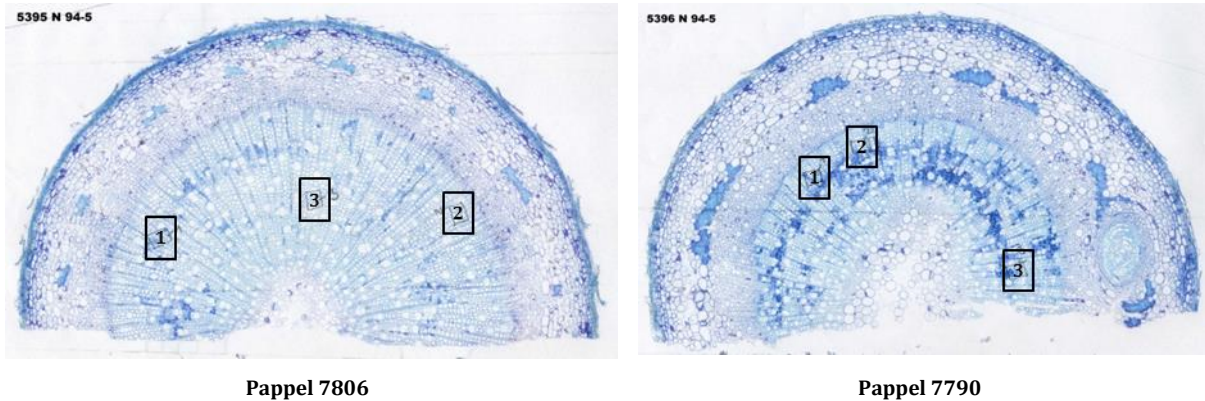


Abb. 3.33: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Sprossquerschnitten von N 94-5

Während in Pappel 7806 die Struktur noch sehr regelmäßig aufgebaut war, wirkte die Struktur in Pappel 7790 eher zufällig und variabel. Im Bereich des Xylems waren durch Toluidinblau intensiv gefärbte Bereiche zu sehen, die auf verstärkte Zellwände hinwiesen. Die mit 1-3 nummerierten Bereiche markierten die UMSP-Testbereiche, deren Analysen im Folgenden dargestellt sind. Die Querschnitte wurden am Thünen-Institut für Holzforschung (U. Schmitt) angefertigt.

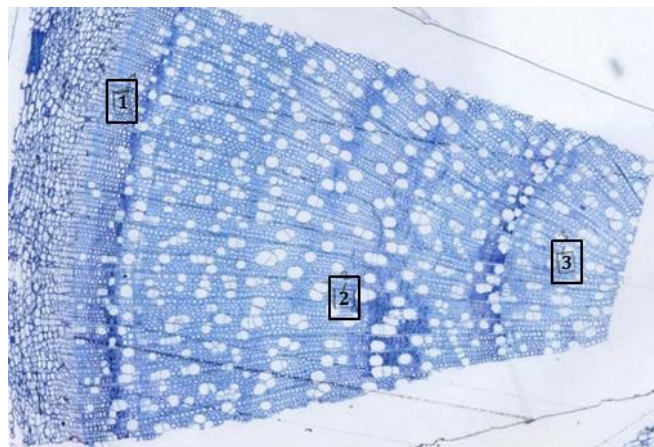


Abb. 3.34: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Sprossquerschnitts von Esch5 als Kontrollpflanze

Der mit Toluidinblau gefärbte Querschnitt wurde am Thünen-Institut für Holzforschung (U. Schmitt) angefertigt. Drei Ausschnitte dieses Querschnitts von Pappel 6384 wurden für die nachfolgende UMSP-Analyse verwendet (Bereiche 1-3).

Von der Pappel 20052, Linie N 94-6, wurde ebenfalls ein mit Toluidinblau gefärbter Sprossquerschnitt angefertigt. Besondere Auffälligkeiten in der Gewebestruktur oder bezüglich der Zellwanddicke wurden nicht festgestellt (Abb. 3.35).

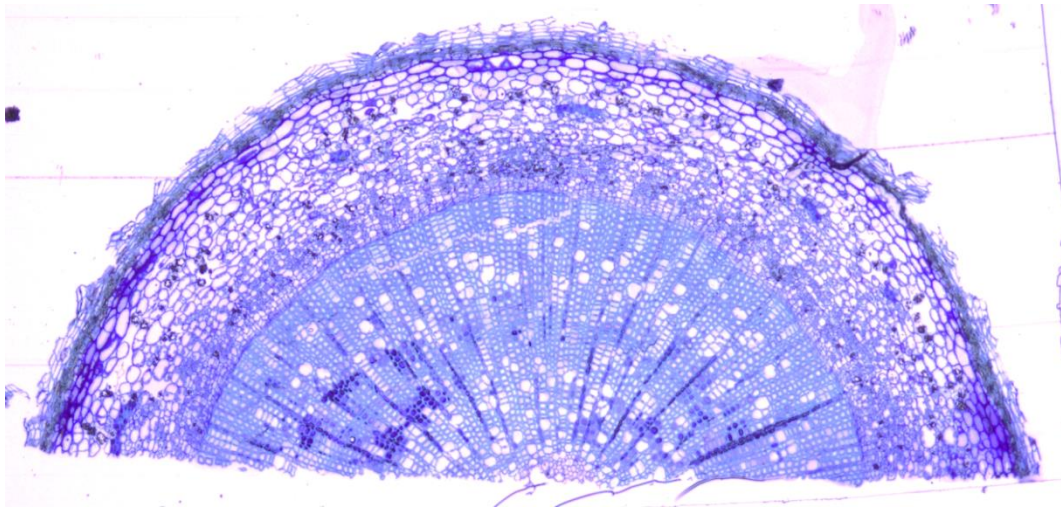


Abb. 3.35: Angefärbter Sprossquerschnitt einer Pflanze der Linie N 94-6

Der mit Toluidinblau angefärbte Sprossquerschnitt wurde am Thünen-Institut für Holzforschung (U. Schmitt) angefertigt. Verwendet wurde hier der Spross der neun Monate alten Pappel 20052. Auffällige Abweichungen zum Esch5-Wildtyp wurden nicht gefunden.

Mit einer UMSP-Analyse wurde die Ligninverteilung im Sprossgewebe analysiert. Im Individuum 7806 wurde insgesamt eine Absorbtion festgestellt, die auf eine starke Lignifizierung der sekundären Zellwände hindeutet. Im Individuum 7790 waren die Umrisse der Zellwände durch die niedrige UV-Absorbtion teilweise nicht scharf zu erkennen, allerdings kam dies auch bei einem Bildausschnitt des Esch5-Wildtyps vor. Bei diesem Individuum enthielten die Zellwände den Ergebnissen der UMSP-Analysen zufolge nur wenig Lignin (Abb. 3.36).

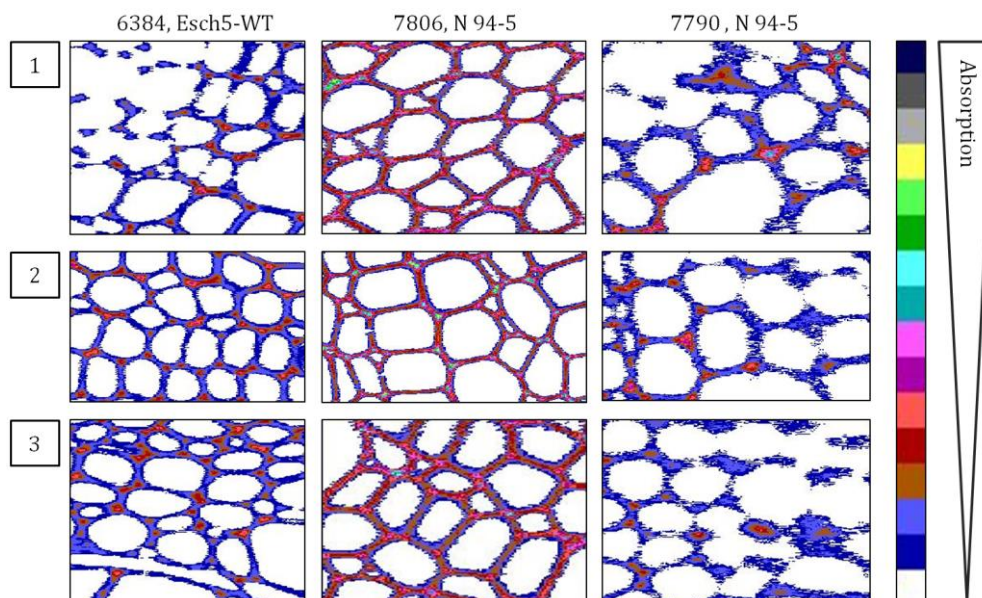


Abb. 3.36: UMSP-Analyse der Sublinie N 94-5

Die Sprossquerschnitte wurden in 10 cm Höhe gesetzt. Die Analysen der zwei Pappeln 7806 und 7790 sowie eines Esch5-Wildtyps wurden am Thünen-Institut für Holzforschung durchgeführt (U. Schmitt). Die mit 1-3 nummerierten Bereiche wurden in den Abbildungen 3.32 und 3.33 markiert. Eine höhere Absorbtion lässt sich auf einen höheren Ligningehalt übertragen. Die Analysen der drei ausgewählten Bereiche zeigten eine starke Ligninverteilung in der Pappel 7806. In der Pappel 7790 war etwa vergleichbar viel Lignin wie im Wildtyp von Esch5 (Pappel 6384) eingelagert.

Die Doppeltransformationen zur parallelen Überexpression von *AtSOC1* und *SaFUL* hatte in beiden Versuchsklonen starke Auswirkungen auf den Phänotyp der Pflanzen: In Esch5 wurde ein kleinwüchsiger Phänotyp mit veränderter Blattmorphologie beobachtet. Sie waren teilweise durch eine veränderte Morphologie, und bei einzelnen Individuen auch Holzanatomie, gekennzeichnet. Auch in den Versuchen mit dem Klon P1 wurde der veränderte Phänotyp mit kleinbleibenden Pappeln beobachtet.

3.2 Genetische Modifikation weiterer Kandidatengene

3.2.1 Genetische Modifikation von Potri.007G008600

Für das Gen Potri.007G008600 (ehemals POPTR_0007s14560) lagen keine funktionellen Annotationen in der Genomdatenbank von *P. trichocarpa* vor (Phytozome 11, <https://phytozome.jgi.doe.gov>, Zugriff am 30.01.2016). Die Sequenz ist auf dem Plus-Strang von Chromosom 7 im Bereich 676.557-680.622 lokalisiert. Das Transkript Potri.007G008600.1 wird nach den Daten des eFP-Browsers besonders stark in den weiblichen sowie männlichen Kätzchen exprimiert, zudem in Xylem, Keimlingen, jungen Blättern und Wurzeln (<http://bar.utoronto.ca/efppop/cgi-bin/efpWeb.cgi>, Zugriff am 10.02.2016, Abb. 3.37).

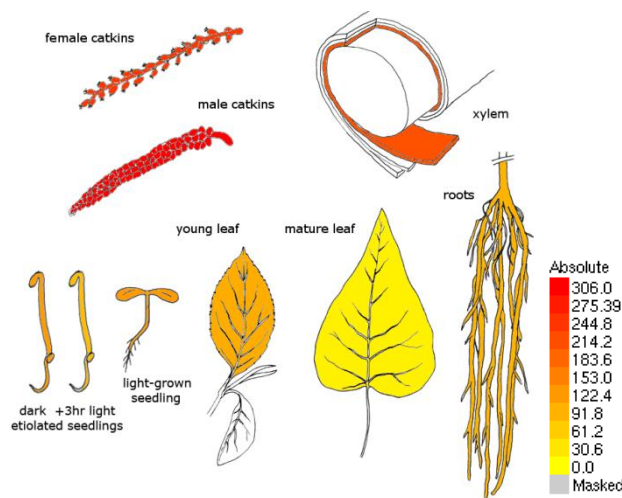


Abb. 3.37: Expressionsdaten des Transkripts Potri.007G008600.1 in verschiedenen Pappelgeweben

Potri.007G008600.1 wird insbesondere in den weiblichen und männlichen Kätzchen sowie dem sich entwickelndem Xylem exprimiert, allerdings auch mit geringerer Intensität in den übrigen Gewebetypen (Quelle: <http://bar.utoronto.ca/efppop/cgi-bin/efpWeb.cgi>, Zugriff am 10.02.2016).

In sechs einzelnen Transformationen, darunter Überexpressions- und *Knockdown*-Ansätze, wurde das bislang nicht charakterisierte oder annotierte Gen Potri.007G008600 modifiziert. Die genetischen Modifikationen führten nur in wenigen Einzelfällen zu signifikanten Phänotypänderungen, die allerdings nicht einheitlich waren, da unter anderem größere und kleinere Individuen identifiziert wurden. Diese Beobachtungen wurden vor allem nach der zweiten Vegetationsperiode gemacht, sodass hier wahrscheinlich Kultureffekte maßgeblich waren und nicht die genetischen Veränderungen.

3.2.1.1 Überexpression

Zur Überexpression von Potri.007G008600 wurde die Transformation N 311 durchgeführt. Der verwendete Transformationsvektor A194 kodierte für die Überexpression von Potri.007G008600 und die Kanamycinresistenz *NPTII* zur Selektion. Empfängerorganismus war der *P. × canescens*-Klon P1.

Molekulargenetische Untersuchungen

Aus der Transformation gingen elf putativ transgene Sublinien hervor. Per PCR und anschließender Gelelektrophorese wurde die Anwesenheit des Selektionsmarkers *NPTII* überprüft. Die Linien N 311-6b, N 311-10 und N 311-11 enthielten das Resistenzgen (Abb. 3.38).

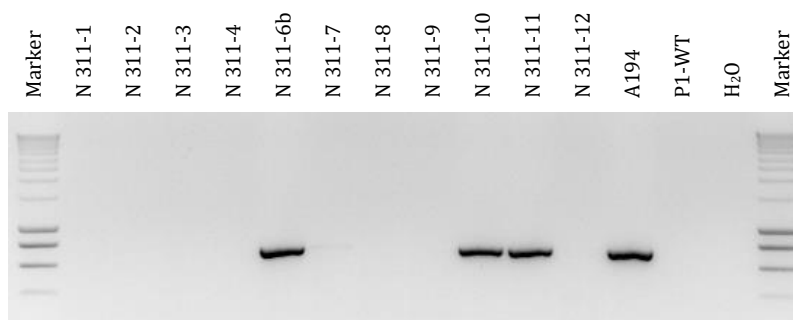


Abb. 3.38: Gelelektrophoretischer Nachweis des Selektionsmarkers *NPTII*

Die PCR wurde mit den Primern #343 und #344 bei einer *Annealing*-Temperatur von 62 °C und mit 37 Amplifikationszyklen durchgeführt. 5 µL der PCR-Produkte wurden auf einem 1,3% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. Der Selektionsmarker *NPTII* wurde in den Linien N 311-6b, -10 und -11 nachgewiesen.

Einige Sublinien starben während der weiteren Kultivierung auf Selektionsmedium ab. Die noch verfügbaren Sublinien wurden auf die Anwesenheit des Zielgens überprüft. Das Ergebnis der PCR zum Nachweis des Resistenzmarkers konnte bestätigt werden: N 311-6b, -10 und -11 enthielten die Zielgensequenz (Abb. 3.39). Alle weiteren getesteten Linien enthielten das Zielgen nicht.

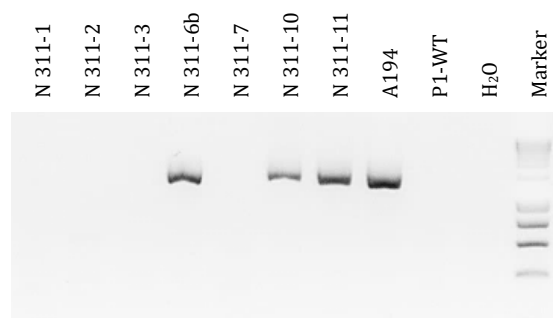


Abb. 3.39: Gelelektrophoretischer Nachweis der Zielgene

Die PCR wurde mit dem Primerpaar #1448 und #1361 durchgeführt. Die *Annealing*-Temperatur betrug 53 °C für 0:45 min, die Elongationszeit 1:45 min. Es wurden 38 Amplifikationszyklen absolviert. 5 µL der PCR-Produkte wurden auf einem 1,5% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. Das Zielgen wurde in den Linien N 311-6b, -10 und -11 nachgewiesen.

Zur Quantifizierung der Kopienanzahl, mit der die T-DNA von A194 in das Pappelgenom der einzelnen Sublinien von N 311 integriert wurde, wurde mit der Sonde für die Kanamycinresistenz *NPTII* ein Southern Blot durchgeführt. N 311-6b enthielt zwei Kopien der T-DNA, N 311-10 und -11 enthielten jeweils eine Kopie (Abb. 3.40). Entsprechend den PCR-Ergebnissen waren die anderen Sublinien der Transformation N 311 nicht transgen und wurden verworfen.

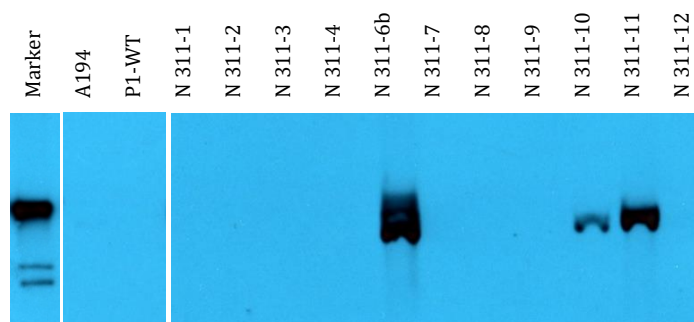


Abb. 3.40: Southern Blot zur Quantifizierung der Kopienanzahl in N 311

Die DNA für dieses Southern Blot wurde mit *EcoRI* restringiert. Die Digoxigenin-markierte Sonde bindet im Markergen *NPTII* und wurde mit den Primern #317 und #318 synthetisiert. Die Sonde ist 780 bp lang. Als Fragmentlängenmarker wurde der DIG-Marker II (Fa. Roche, Mannheim) verwendet. Eine Kopie der T-DNA wurde in N 311-10 und -11 nachgewiesen, zwei Kopien in N 311-6b.

Phänotypisierung

Zur Analyse der Pflanzen unter naturnahen Bedingungen außerhalb der Gewebekultur wurden zahlreiche Pflanzen von N 311-6b, N 311-10 und N 311-11 zusammen mit nicht-transgenen Kontrollpflanzen ins Gewächshaus überführt. Die Gesamthöhen der Pappeln, die nach 17 bzw. sieben Monaten gemessen wurden, wichen nicht signifikant von den Kontrollpflanzen ab ($p > 0,05$, Tab. 3.23, Abb. 3.41).

Tab. 3.23: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linie N 311 im Gewächshaus

Die Gesamthöhen der Pappeln wurden nach 17 bzw. sieben Monaten Kultur erhoben. Signifikante Mittelwertabweichungen ($p \leq 0,05$) wurden nicht beobachtet.

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standardabweichung [cm]	p	Signifikanz
17 Monate Kultur, zwei Vegetationsperioden						
Kontrollen	5	257	254	28		
N 311-10	9	224	252	57	0,20	nein
N 311-11	9	271	261	46	0,52	nein
7 Monate Kultur, eine Vegetationsperiode						
Kontrollen	9	102	104	15		
N 311-6b	8	74	65	32	0,06	nein

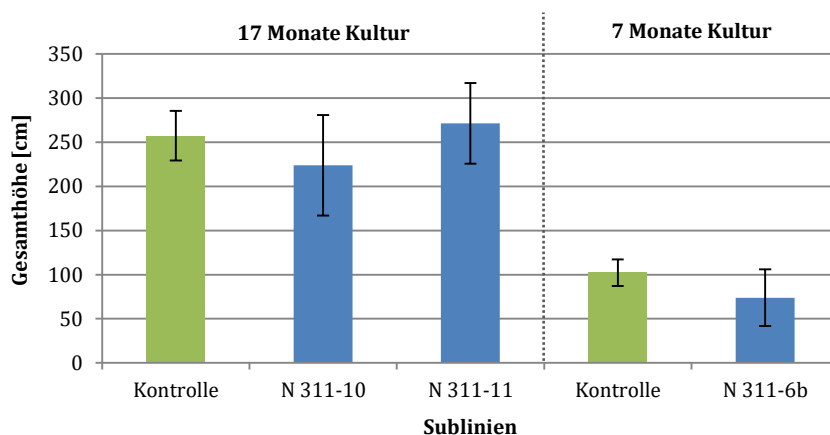


Abb. 3.41: Mittelwertvergleich der Gesamthöhenmessungen von N 311

Die Höhenmessungen wurden nach 17- und siebenmonatiger Kultivierung vorgenommen. Signifikant abweichende Linien ($p \leq 0,05$) wurden nicht identifiziert. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an.

Holzchemische Analysen

Von den drei Pappeln 15508, 15509 und 15510 der Sublinie N 311-11 sowie von drei nicht-transgenen Kontrollpflanzen (15482, 15483, 15484) wurden die Sprosse nach 18-monatiger Kultivierung für die Analyse ihrer biochemischen Zusammensetzung an das Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung (Potsdam, K. Hettrich) übergeben. Im Vergleich zu den nicht-transgenen Kontrollpflanzen wurden keine signifikanten Abweichungen in der biochemischen Zusammensetzung der Biomasse festgestellt (Tab. 3.24).

Tab. 3.24: Prozentuale chemische Zusammensetzung des Sprossgewebes von drei Individuen der Linie N 311-11

Die Mittelwerte der einzelnen Bestandteile entsprachen etwa den Mittelwerten der nicht-transgenen Kontrollpflanzen. Signifikante Abweichungen ($p \leq 0,05$) lagen nicht vor. Die Analysen wurden am Fraunhofer IAP durchgeführt (K. Hettrich). Abkürzungen: M - Mittelwert, s - Standardabweichung, p - Irrtumswahrscheinlichkeit für signifikante Abweichung.

Bestandteile	N 311-11			Nicht-transgene Kontrollen	
	M	s	p	M	s
Asche	2,2	0,0	0,07	2,4	0,1
Protein	4,6	1,4	0,91	4,7	1,1
Ethanol-Extraktstoffe	14,8	1,6	0,86	15,1	1,6
Cellulose	35,2	2,0	0,66	34,3	1,4
Hemicellulose	22,4	0,3	0,42	21,8	0,7
Lignin	17,8	0,1	0,80	17,9	0,3

3.2.1.2 Herunterregulation

Zum *Knockdown* von Potri.007G008600 wurden fünf unterschiedliche Transformationsvektoren verwendet: A198 (N 314), A211 (N 356), A225 (N 368), A228 (N 371) und A230 (N 373). Alle Vektoren kodierten für das selbe Zielgen, allerdings wurden die Vektoren mit unterschiedlichen Rückgraten konstruiert, bei denen auf miRNA319 und miRNA408 nach Shi *et al.* (2010) zurückgegriffen wurde. Ein konsistenter Unterschied wurde zwischen den unterschiedlichen Rückgraten nicht beobachtet. Die Vektoren beinhalteten zusätzlich die Kanamycinresistenz *NPTII* als Selektionsmarker. Alle Transformationen wurden mit dem *P. × canescens*-Klon P1 durchgeführt.

Molekulargenetische Untersuchungen

Der Transformationserfolg wurde bei allen Linien auf molekulargenetischer Ebene überprüft, wie im Folgenden exemplarisch für N 373 gezeigt wird, indem die Anwesenheit des Selektionsmarkers (Abb. 3.42) und des Zielgens (Abb. 3.43) nachgewiesen wurden.

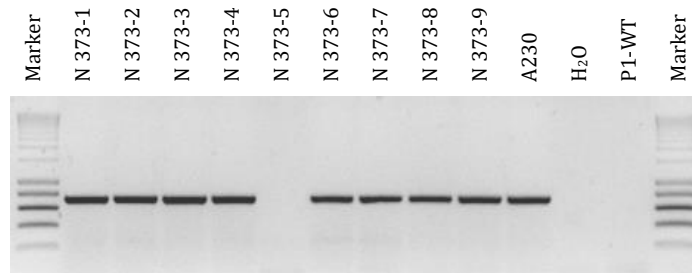


Abb. 3.42: Gelelektrophoretischer Nachweis des Selektionsmarkers *NPTII*

Die PCR wurde mit den Primern #343 und #344 bei einer *Annealing*-Temperatur von 60 °C und mit 40 Amplifikationszyklen durchgeführt. 5 µL der PCR-Produkte wurden auf einem 1,3% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. Acht der neun Sublinien von N 373 enthielten das Resistenzgen.

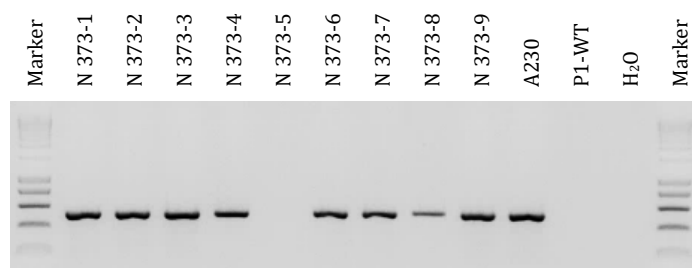


Abb. 3.43: Gelelektrophoretischer Nachweis des Zielgens

Die PCR wurde mit den Primern #1446 und #1447 bei einer *Annealing*-Temperatur von 53 °C und mit 35 Amplifikationszyklen durchgeführt. 5 µL des Ansatzes wurden auf einem 1,5% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. Acht der neun Sublinien enthielten das Zielgen.

Insgesamt wurden aus allen fünf Transformationen 49 putativ transgene Regenerate herangezogen. 35 davon beinhalteten das Kanamycin-Resistenzgen sowie das Zielgen (Tab. 3.25). Nach der folgenden Quantifizierung der Kopienzahlen wurden kapazitätsbedingt einzelne Sublinien zur weiteren Bearbeitung ausgewählt, sodass nicht alle Linien weiter untersucht wurden.

Tab. 3.25: Nachweis des Transformationserfolgs zur Überexpression von Potri.007G008600

Linie	Putativ transgene Regenerate	Sublinien mit nachgewiesenem Selektionsmarker	Sublinien mit nachgewiesenem Zielgen
N 314	1	1	1
N 356	10	4	4
N 368	14	8	8
N 371	15	14	14
N 373	9	8	8

Per Southern Blot wurde die Kopienanzahl quantifiziert, mit der die T-DNA der Transformationsvektoren in den einzelnen Sublinien vorlag, wie nachfolgend exemplarisch für N 371 gezeigt wird (Abb. 3.44). Für alle Blots wurde die Sonde zur Hybridisierung am Selektionsmarker *NPTII* verwendet. In mehreren Sublinien wurden eine bis vier Kopien der T-DNA detektiert, in jeweils einem Fall fünf und sieben Kopien (Tab. 3.26).

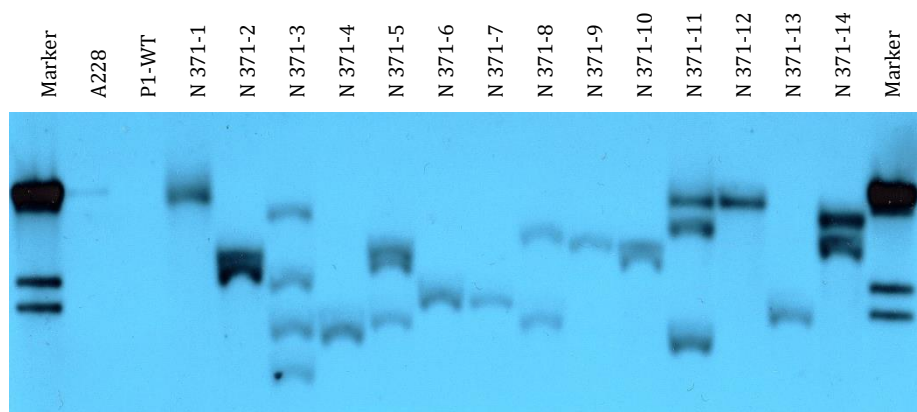


Abb. 3.44: Southern Blot zur Quantifizierung der Kopienanzahl in N 371

Die DNA für dieses Southern Blot wurde mit *EcoRI* restringiert. Die Digoxigenin-markierte Sonde bindet im Markergen *NPTII* und wurde mit den Primern #317 und #318 synthetisiert. Die Sonde ist 780 bp lang. Als Fragmentlängenmarker wurde der DIG-Marker II (Fa. Roche, Mannheim) verwendet.

Tab. 3.26: Ermittelte Kopienzahlen in unabhängigen transgenen Linien von N 373, N 356, N 368 und N 371

Per Southern Blot-Analyse wurden die Kopienzahlen der T-DNA von A198 (N 314), A211 (N 356), A225 (N 368), A228 (N 371) und A230 (N 373) im Pappelgenom quantifiziert. Nach der Quantifizierung der Kopienzahlen wurden kapazitätsbedingt einzelne Sublinien zur weiteren Bearbeitung ausgewählt, sodass nicht alle Linien weiter untersucht wurden.

Kopienzahlen der T-DNA	Transgene Linien	
1	N 356-1 N 368-4, -7, -8, -13	N 371-1, -4, -6, -7, -9, -12, -13 N 373-2, -4, -7, -8
2	N 314-1 N 356-10 N 368-1, -6	N 371-2, -8, -10, -14 N 373-9
3	N 368-3 N 371-5, -11	N 373-6
4	N 356-9, -11 N 368-2	N 371-3
5	N 373-1	
7	N 373-3	

Zur Ermittlung der T-DNA-Integrationsorte und zur Prüfung von möglichen Positionseffekten wurden TAIL-PCRs mit 128-fach bzw. 256-fach degenerierten Primern sowie den spezifischen Primern #1923 für TAIL-PCR I, #1922 für TAIL-PCR II und #1921 für TAIL-PCR III durchgeführt. Die Primer amplifizierten die DNA über die *Left Border* hinaus. Die genomischen Bereiche außerhalb der T-DNA wurden mit einer *BLAST*-Analyse in *P. trichocarpa* und *P. × canescens* detektiert (<https://phytozome.jgi.doe.gov>, <http://aspen.db.uga.edu/spta717/Blast>, Zugriff am 06.04.16). Die identifizierten Bereiche sind in Tab. 3.27 zusammengefasst.

Tab. 3.27: Identifizierte Integrationsorte der T-DNA in ausgewählten transgenen Sublinien

Die Integrationsorte wurden durch eine *BLAST*-Analyse in den Datenbanksequenzen von *P. trichocarpa* (*Pt*, Version 3.0) und *P. × canescens* (*Pc*, Version 1.1) ermittelt. Die Angaben zu den funktionellen Annotierungen der Loci basieren auf *P. trichocarpa*. Farblich hinterlegt sind die Linien mit signifikant abweichender Gesamthöhe.

Sublinie	Integrationsort	Datenbank-Art	Score <i>Pt</i> (<i>Pc</i>)	E-Wert <i>Pt</i> (<i>Pc</i>)	Funktionelle Annotierung des Integrationslocus
N 371-1	Chromosom 5	<i>Pt, Pc</i>	282,6 (285)	5,4E-75 (7E-76)	Potri.005G080000 (Exon)
N 371-3	Chromosom 2	<i>Pt</i>	71,5	4,9E-11	Potri.002G188000 (Exon)
	Chromosom 17	<i>Pt, Pc</i>	66,2 (67,6)	9,2E-11 (4E-11)	ohne funktionelle Annotierung
N 371-4	Chromosom 10	<i>Pt, Pc</i>	509,8 (553)	5,4E-143 (5E-156)	ohne funktionelle Annotierung
N 371-5	Chromosom 9	<i>Pt, Pc</i>	392,6 (429)	2E-107 (2E-118)	Potri.009G035400 (3' UTR)
	Chromosom 6	<i>Pt, Pc</i>	334,9 (366)	3,2E-90 (5E-100)	ohne funktionelle Annotierung
N 371-7	Chromosom 1	<i>Pt, Pc</i>	1361,0 (1456)	0,0 (0,0)	ohne funktionelle Annotierung
N 371-13	Chromosom 15	<i>Pt, Pc</i>	333,1 (339)	5,4E-90 (9E-92)	Potri.015G108600 (Intron)
N 373-1	Chromosom 1	<i>Pt</i>	66,2	3,9E-10	Potri.001G337700 (Exon)
N 373-3	Chromosom 1	<i>Pt, Pc</i>	261,0 (270)	1,6E-68 (2E-71)	Potri.001G143200 (5' UTR)
N 373-6	Chromosom 2	<i>Pt, Pc</i>	562,1 (477)	1E-158 (3E-132)	ohne funktionelle Annotierung

In N 371-1 wurde die T-DNA in Chromosom 5 integriert, hier innerhalb des Gens Potri.005G080000. Das entsprechende Protein enthielt eine Tyrosinkinase-Domäne. Tyrosinkinasen katalysieren die Phosphorylierung der Hydroxygruppe der Aminosäure Tyrosin (Hanks *et al.* 1988).

In der Linie N 371-3 wurden zwei Integrationsorte ermittelt: Chromosom 2 und 17. Während der Locus in Chromosom 17 ohne funktionelle Annotierung war, lag die identifizierte Sequenz von Chromosom 2 im Gen Potri.002G188000. Dieses Gen war funktionell nicht annotiert oder charakterisiert. Obwohl nach den Southern Blot-Ergebnissen mehr Kopien der T-DNA in dieser Sublinie vorlagen, wurden keine weitere Loci identifiziert.

In Chromosom 9 wurde die T-DNA von N 371-5 integriert. Betroffen war hier die untranslatierte Region am 3'-Ende (3' UTR) von Potri.009G035400. Dieses Gen kodierte für ein Protein mit einer Proteinkinase- und einer Leguminosenlectin-Domäne. Lectine sind Kohlenhydrat-bindende Proteine, die dadurch in verschiedenen Reaktionen beteiligt sind (Sharon & Lis 1990).

In Linie N 371-13 wurde von Chromosom 15 eine Region identifiziert, die für ein Intron von Potri.015G108600 kodierte. Potri.015G108600 wies Ähnlichkeiten zum Gen *MtN19* aus *Medicago truncatula* GAERTN. auf, das durch Stress induziert wird (Curto *et al.* 2014).

In der Sublinie N 373-1 wurde Chromosom 1 als Integrationsort identifiziert. Hier lag die T-DNA im Gen Potri.001G337700. Dieses uncharakterisierte Protein hatte Ähnlichkeiten zum ebenfalls nicht weiter charakterisierten *Arabidopsis thaliana*-Gen At5g40740.

Der Transgen-Integrationsort von Linie N 373-3 liegt ebenfalls auf Chromosom 1 im Gen Potri.001G143200. Hierbei handelte es sich um eine Acetylornithin-Deacetylase mit dem EC-Code 3.5.1.16, die am Stickstoffmetabolismus beteiligt ist (Vogel 1953).

Die identifizierten Regionen gaben keinen Hinweis darauf, dass signifikant abweichende Pappeln auf einen Positionseffekt zurückzuführen waren.

Phänotypisierung

Zur Analyse der Pflanzen unter naturnahen Bedingungen außerhalb der Gewebekultur wurden zahlreiche Pflanzen zusammen mit nicht-transgenen Kontrollpflanzen ins Gewächshaus überführt und hier kultiviert. Nach 16 bzw. 18 Monaten Wachstum wurde die Höhe der Pflanzen von N 373 gemessen und eine möglicherweise signifikante Mittelwertabweichung zu den Kontrollpflanzen berechnet (Tab. 3.28). Die Linie N 373-3 wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit p von 0,00 als signifikant größer als ihre nicht-transgenen Kontrollpflanzen identifiziert (Abb. 3.45). Alle anderen Sublinien zeigten keine signifikanten Mittelwertabweichungen. Auffällige Habitusveränderungen wurden nicht beobachtet.

Tab. 3.28: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linie N 373 im Gewächshaus

Die Pflanzen wurden für 18 bzw. 16 Monate (inkl. einer Winterperiode) im Gewächshaus kultiviert. Anschließend wurden ihre Gesamthöhen gemessen. Eine signifikante Mittelwertabweichung wurde bei $p \leq 0,05$ angenommen. Signifikant größer war die Linie N 373-3 ($p = 0,00$). Trotz nur zwei Monaten Differenz war der Mittelwert der 16 Monate lang kultivierten Kontrollpflanzen 112 cm kleiner als der Mittelwert der älteren Kontrollpflanzen. Die Ursache hierfür konnte nicht geklärt werden. Da nach dem regulären Abschluss der ersten Vegetationsperiode einige Pappeln noch belaubt waren, wurden lediglich die Messwerte nach Abschluss der zweiten Vegetationsperiode verwendet.

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standardabweichung [cm]	p	Signifikanz
18 Monate Kultur, zwei Vegetationsperioden						
Kontrollen	8	256	253	15		
N 373-3	8	302	301	11	0,00	ja, signifikant größer
N 373-4	8	194	202	74	0,09	nein
N 373-8	8	229	243	51	0,21	nein
16 Monate Kultur, zwei Vegetationsperioden						
Kontrollen	7	144	140	67		
N 373-1	7	224	246	57	0,06	nein
N 373-2	8	159	160	45	0,66	nein
N 373-6	7	214	272	81	0,13	nein
N 373-9	7	172	212	79	0,52	nein

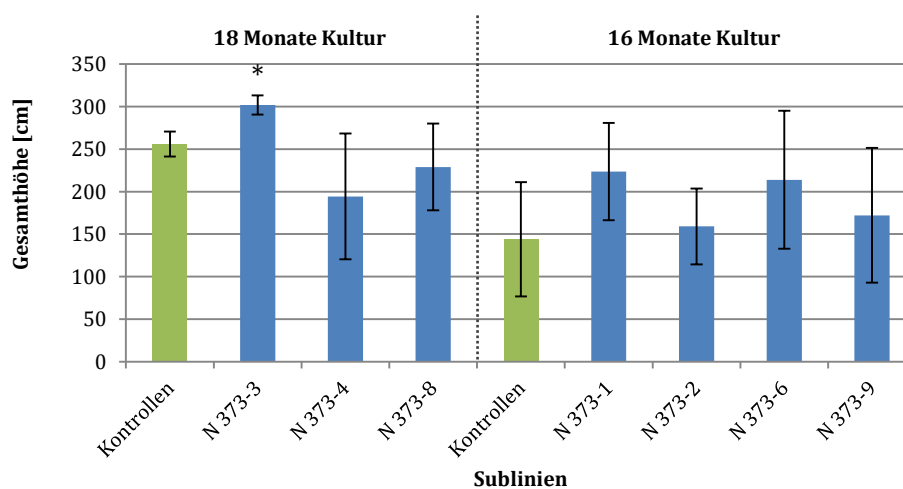


Abb. 3.45: Mittelwertvergleich der Gesamthöhenmessungen von N 373

Die untersuchten Pflanzen wurden 18 bzw. 16 Monate kultiviert. Die signifikant abweichende Linie N 373-3 ($p = 0,00$) ist mit * markiert. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an. Trotz nur zwei Monaten Differenz waren die 16 Monate lang kultivierten Kontrollpflanzen im Mittel 112 cm kleiner als die älteren Kontrollpflanzen. Die Ursache hierfür konnte nicht geklärt werden.

Die Pappeln der Linie N 314-1 wurden kurz vor Ende der regulären Vegetationsperiode ins Gewächshaus überführt. Daher wurden erst nach 15 Monaten, also am Ende der zweiten Vegetationsperiode, die Gesamthöhen der Pappeln von N 314-1 gemessen (Tab. 3.29). Eine signifikante Abweichung des Mittelwerts wurde nicht ermittelt.

Tab. 3.29: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linie N 314-1 im Gewächshaus

Die Pappeln wurden für 15 Monate im Gewächshaus kultiviert. Anschließend wurden ihre Gesamthöhen gemessen. Eine signifikante Mittelwertabweichung ($p \leq 0,05$) wurde nicht ermittelt ($p = 0,22$).

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standardabweichung [cm]	p	Signifikanz
Kontrollen	9	318	315	14		
N 314-1	6	335	340	27	0,22	nein

Die Höhenmessung der transgenen Pflanzen von N 356 nach sieben bzw. 18 Monaten ergab keine signifikanten Mittelwertänderungen im Vergleich zu den nicht-transgenen Kontrollen (Tab. 3.30).

Tab. 3.30: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linie N 356 im Gewächshaus

Die Gesamthöhen wurden nach sieben- und 18-monatiger Kultivierung erhoben. Signifikante Mittelwertabweichungen ($p \leq 0,05$) wurden nicht beobachtet.

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standardabweichung [cm]	p	Signifikanz
7 Monate Kultur, eine Vegetationsperiode						
Kontrollen	9	90	95	16		
N 356-1	8	93	96	22	0,81	nein
N 356-9	8	86	92	21	0,67	nein
N 356-10	8	86	98	26	0,69	nein
18 Monate Kultur, zwei Vegetationsperioden						
Kontrollen	9	242	254	30		
N 356-1	8	239	256	55	0,91	nein
N 356-9	8	231	242	35	0,54	nein
N 356-10	8	226	249	53	0,49	nein

Am Ende der ersten und der zweiten Vegetationsperiode wurde die Gesamthöhe der Pappeln von N 368 gemessen. Bei der ersten Erhebung wurden keine signifikanten Mittelwertabweichungen ermittelt (Tab. 3.31). Bei der zweiten Messung waren die für 18 Monate kultivierten Kontrollpflanzen durchschnittlich kleiner als alle anderen transgenen Sublinien. N 368-1 und -3 waren sogar signifikant größer (Abb. 3.46). Hierbei war zu beachten, dass aufgrund von Platzmangel die Kontrollpflanzen am Rande eines Beets kultiviert wurden und dadurch weniger Licht erhielten als die transgenen Pflanzen.

Tab. 3.31: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linie N 368 im Gewächshaus

Nach einer und zwei Vegetationsperioden wurden die Gesamthöhen der Pappeln gemessen. Eine signifikante Mittelwertabweichung wurde bei $p \leq 0,05$ angenommen. Dieser Wert wurde nach der ersten Vegetationsperiode von allen Linien überschritten. Nach der zweiten Vegetationsperiode wiesen die Linien N 368-1 und N 368-3 signifikante Mittelwertänderungen auf. Hierbei war zu berücksichtigen, dass die Kontrollpflanzen nicht die exakt gleichen Kulturbedingungen hatten wie die transgenen Pflanzen.

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standardabweichung [cm]	p	Signifikanz
7 Monate Kultur, eine Vegetationsperiode						
Kontrollen	16	92	98	19		
N 368-1	9	96	97	16	0,59	nein
N 368-2	10	86	90	28	0,58	nein
N 368-3	9	94	100	18	0,77	nein
N 368-4	6	75	76	16	0,08	nein
N 368-7	10	81	77	25	0,28	nein
5 Monate Kultur, eine Vegetationsperiode						
Kontrollen	11	95	96	10		
N 368-8	11	77	92	26	0,06	nein
N 368-13	5	87	82	12	0,28	nein
18 Monate Kultur, zwei Vegetationsperioden						
Kontrollen	10	187	180	30		
N 368-1	8	240	247	23	0,00	ja, signifikant größer
N 368-2	8	214	239	61	0,31	nein
N 368-3	8	236	254	44	0,03	ja, signifikant größer
N 368-4	6	214	222	41	0,24	nein
N 368-7	8	213	218	47	0,23	nein
16 Monate Kultur, zwei Vegetationsperioden						
Kontrollen	7	186	186	44		
N 368-8	8	152	109	76	0,33	nein
N 368-13	5	202	182	56	0,66	nein

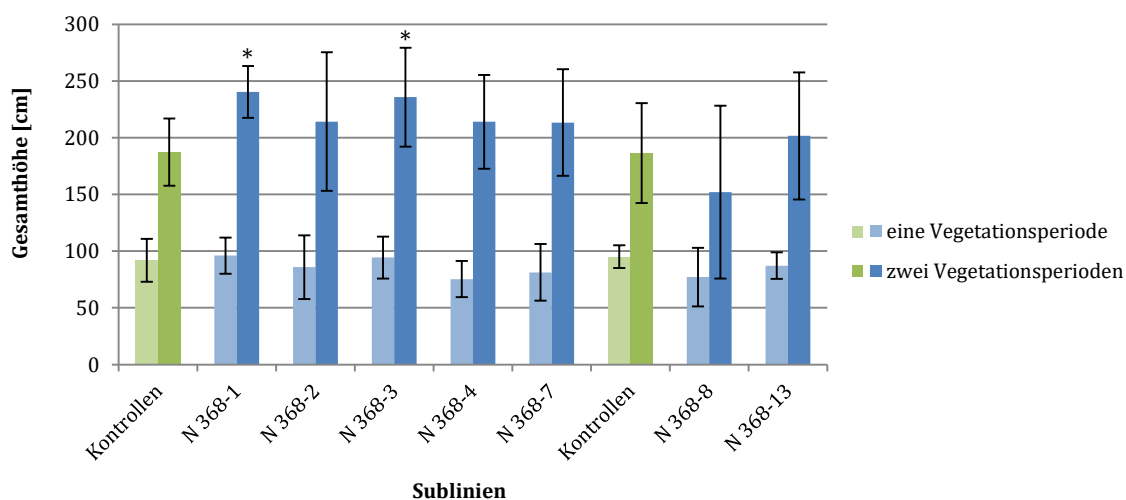


Abb. 3.46 Mittelwertvergleich der Gesamthöhenmessungen von N 368

Signifikant abweichende Linien ($p \leq 0,05$) wurden nach einer Vegetationsperiode nicht identifiziert. Nach zwei Vegetationsperioden waren die Linien N 368-1 und -3 signifikant größer als die nicht-transgenen Kontrollpflanzen (markiert mit *). Hierbei war zu berücksichtigen, dass die Kontrollpflanzen nicht die exakt entsprechenden Kulturbedingungen hatten wie die transgenen Pflanzen. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an.

Die Messdaten von N 371 wurden nach sechs bzw. 19 Monaten Kultur am Ende der ersten und zweiten Vegetationsperiode erhoben (Tab. 3.32). Nach der ersten Vegetationsperiode waren die Linien N 371-3 und -13 signifikant größer. Am Ende der zweiten Vegetationsperiode wurden die drei Linien N 371-5, -7 und -13 als signifikant kleiner ermittelt (Abb. 3.47). Hier waren keine weiteren Linien signifikant abweichend.

Tab. 3.32: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linie N 371 im Gewächshaus

Die Gesamthöhen der Pappeln wurden nach sechs- bzw. 19-monatiger Kultivierung erhoben. Eine signifikante Mittelwertabweichung ($p \leq 0,05$) wurde zunächst bei N 371-3 und -13, später bei N 371-5, -7 und -13 beobachtet.

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standardabweichung [cm]	p	Signifikanz
6 Monate Kultur, eine Vegetationsperiode						
Kontrollen	10	92	89	16		
N 371-1	5	88	92	26	0,80	nein
N 371-2	13	96	101	19	0,58	nein
N 371-3	9	106	107	8	0,04	ja, signifikant größer
N 371-4	11	82	81	21	0,30	nein
N 371-5	11	94	104	23	0,80	nein
N 371-6	8	97	96	14	0,49	nein
N 371-7	12	79	84	19	0,13	nein
N 371-9	6	110	121	33	0,28	nein
N 371-12	10	102	103	18	0,23	nein
N 371-13	11	107	107	10	0,03	ja, signifikant größer
19 Monate Kultur, zwei Vegetationsperioden						
Kontrollen	8	257	254	15		
N 371-1	5	229	249	55	0,36	nein
N 371-2	8	224	237	58	0,18	nein
N 371-3	8	258	267	18	0,90	nein
N 371-4	8	214	238	66	0,13	nein
N 371-5	8	217	230	44	0,05	ja, signifikant kleiner
N 371-6	8	238	253	30	0,17	nein
N 371-7	8	208	227	48	0,03	ja, signifikant kleiner
N 371-9	6	242	269	66	0,63	nein
N 371-12	8	249	265	35	0,58	nein
N 371-13	8	225	230	23	0,01	ja, signifikant kleiner

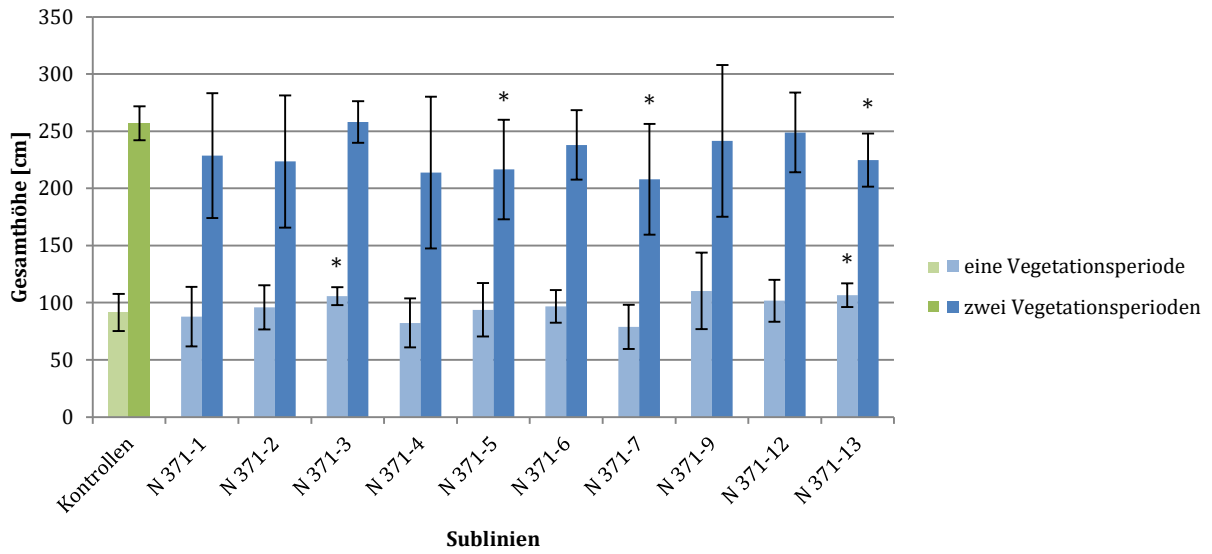


Abb. 3.47: Mittelwertvergleich der Gesamthöhenmessungen von N 371

Die Messdaten wurden nach einer und nach zwei Vegetationsperioden erhoben. Signifikant abweichende Linien ($p \leq 0,05$) sind mit * markiert. Nach der ersten Vegetationsperiode waren zwei Sublinien signifikant größer, nach der zweiten Vegetationsperiode drei Sublinien jedoch signifikant kleiner. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an.

3.2.2 Genetische Modifikation von Potri.002G034400

Das Gen Potri.002G034400 (ehemals POPTR_0002s03580) ist auf Chromosom 2 lokalisiert, auf dem Minus-Strang im Bereich 2.217.751-2.220.507. Hierfür lagen mehrere funktionelle Annotationen vor. Das PANTHER-Klassifizierungssystem (kurz für „**P**rotein **A**nalysis **T**hrough **E**volutionary **R**elationships“) stuft das Protein als NAD-abhängige Epimerase/Dehydratase ein.

In der Datenbank war für dieses Gen auch die Alternativbenennung *PCBER1* (für *PHENYLCOUMARAN BENZYLIC ETHER REDUCTASE 1*) hinterlegt sowie die Ähnlichkeit zu einer Isoflavon-Reduktase aus *Pisum sativum* erwähnt (<https://phytozome.jgi.doe.gov>, Zugriff am 30.01.2016). Von Potri.002G034400 lagen drei unterschiedliche Transkriptmodelle vor. Das Transkript Potri.002G034400.1 bestand aus fünf Exons, Potri.002G034400.2 aus vier Exons und Potri.002G034400.3 aus drei Exons (<https://phytozome.jgi.doe.gov>, Zugriff am 30.01.2016, Abb. 3.48).

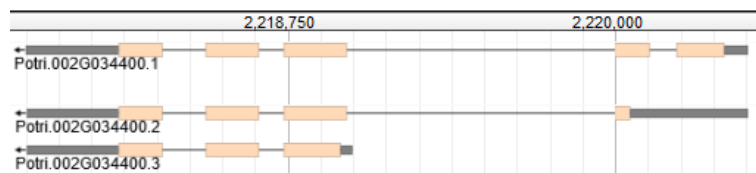


Abb. 3.48: Transkriptmodelle von Potri.002G034400

Für Potri.002G034400 lagen drei Transkriptmodelle vor, die sich in der Anzahl ihrer Introns sowie der Länge der 3' UTR unterschieden. Quelle: Phytozome 11, <https://phytozome.jgi.doe.gov>, Zugriff am 30.01.2016.

Eine Analyse des Gens im eFP-Browser ergab, dass es stark in den männlichen und weiblichen Kätzchen sowie im sich entwickelnden Xylem exprimiert wird (<http://bar.utoronto.ca/efppop/cgi-bin/efpWeb.cgi>, Zugriff am 10.02.2016, Abb. 3.49).

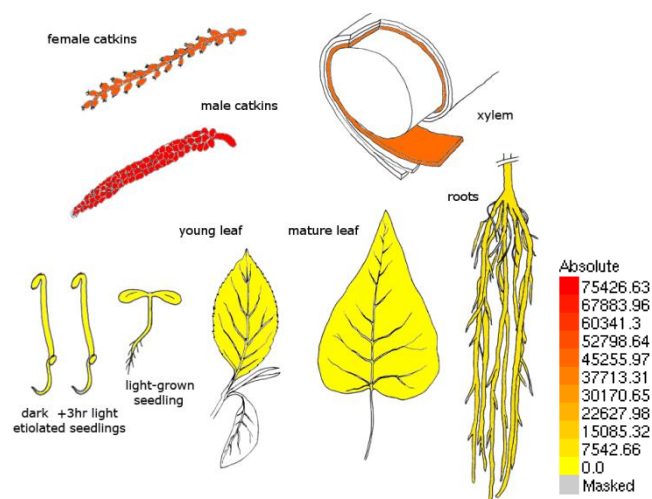


Abb. 3.49: Expressionsdaten der Transkripte von Potri.002G034400 in verschiedenen Pappelgeweben

Für alle fünf Transkripte wurden die gleichen Expressionsdaten ausgegeben (Quelle: <http://bar.utoronto.ca/efppop/cgi-bin/efpWeb.cgi>, Zugriff am 10.02.2016). Sie werden stark in den Kätzchen und dem sich entwickelnden Xylem exprimiert.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der genetischen Modifikation des Gens Potri.002G034400 beschrieben. Die Überexpression von Potri.002G034400 führte nicht zu konsistenten Phänotypenveränderungen. Die Herunterregulation von Potri.002G034400 führte zu vielen signifikant

abweichenden Phänotypen, wobei der beobachtete Phänotyp nicht in allen Linien konsistent war. Mehrere Sublinien mit veränderten Phänotypen wurden in den *Knockdown*-Linien N 369 und N 399 identifiziert, deren Pflanzenhöhe abweichend von den nicht-transgenen Kontrollen war. Hier wurden sowohl signifikant größere als auch signifikant kleinere Pflanzen beobachtet. In einem Fall war auch die Biomassezusammensetzung signifikant verändert. Auswirkungen der unterschiedlichen miRNA-Rückgrate wurden nicht beobachtet.

3.2.2.1 Überexpression

Zur Überexpression von Potri.002G034400 wurde die Transformation N 282 mit dem Vektor A185 durchgeführt, der neben dem Zielgen für die Hygromycinresistenz *HPT* zur Selektion kodierte. Empfängerorganismus war der *P. × canescens*-Klon P1.

Molekulargenetische Untersuchungen

Aus der Transformation wurden acht putativ transgene Sublinien herangezogen. Per PCR und anschließender Gelelektrophorese wurde die Anwesenheit des Selektionsmarkers *HPT* überprüft. Die Sublinien N 282-2 bis N 282-8 enthielten das Resistenzgen; von N 282-1 war das Ergebnis nicht eindeutig positiv (Abb. 3.50).

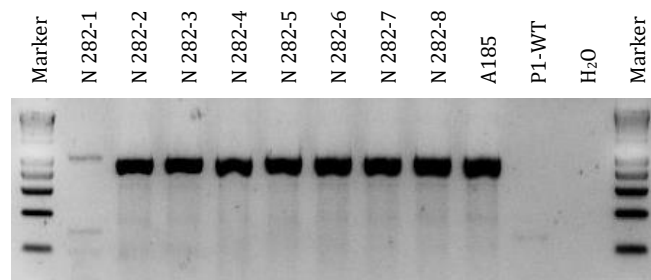


Abb. 3.50: Gelelektrophoretischer Nachweis des Selektionsmarkers *HPT*

Die PCR wurde mit den Primern #337 und #338 bei einer *Annealing*-Temperatur von 58 °C und mit 40 Amplifikationszyklen durchgeführt. 5 µL der PCR-Produkte wurden auf einem 2,0% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. Eindeutig positiv war der Nachweis in den Linien N 282-2 bis -8.

Die Sublinien N 282-3, -4, -5, -6 und -7 wurden auf die Anwesenheit des Zielgens überprüft. Die Zielsequenz wurde in den Linien N 282-5, -6 und -7 nachgewiesen, allerdings nicht in den Linien N 282-3 und -4 (Abb. 3.51). Basierend auf den untenstehenden Southern Blot-Ergebnissen wurden die Linien N 282-1, -2 und -8 nicht bearbeitet.

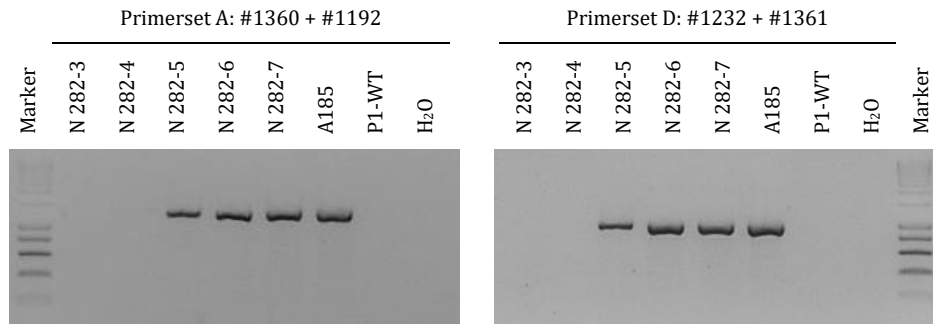


Abb. 3.51: Gelelektrophoretischer Nachweis des Zielgens

Die PCR wurde bei einer *Annealing*-Temperatur von 53 °C und mit 38 Amplifikationszyklen durchgeführt. Als Primer wurden verwendet: #1360 und #1192 (A, PCR-Produkt 1252 bp lang) sowie #1232 und #1361 (D, PCR-Produkt 955 bp lang). 5 µL des Ansatzes wurden auf einem 1,5% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. Das Zielgen wurde in den Linien N 282-55, -6 und -7 nachgewiesen.

Zur Quantifizierung der Kopienanzahl, mit der die T-DNA von A185 in das Pappelgenom integriert wurde, ist ein Southern Blot durchgeführt worden. Jeweils eine Kopie wurde ermittelt in den Linien N 282-3, -5 und -7, jeweils zwei Kopien in N 282-1, -2 und -4 sowie jeweils drei Kopien in N 282-6 und -8 (Abb. 3.52).

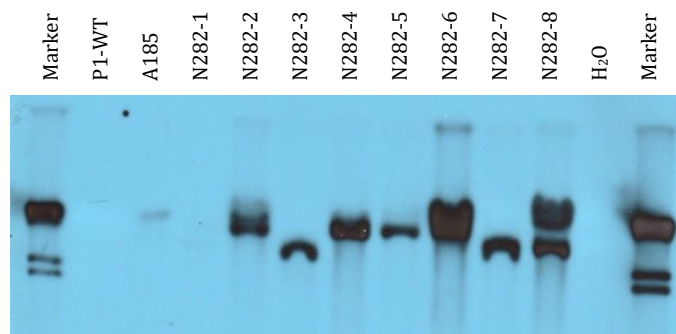


Abb. 3.52: Southern Blot zur Quantifizierung der Kopienanzahl in N 282

Die DNA für dieses Southern Blot wurde mit *SacI* restringiert. Die Digoxigenin-markierte Sonde bindet im Markergen *HPT* und wurde mit den Primern #337 und #338 synthetisiert. Die Sonde ist 988 bp lang. Als Fragmentlängenmarker wurde der DIG-Marker II (Fa. Roche, Mannheim) verwendet.

Phänotypisierung

Zur Analyse der Pflanzen unter naturnahen Bedingungen außerhalb der Gewebekultur wurden zahlreiche Pflanzen von ausgewählten Sublinien zusammen mit nicht-transgenen Kontrollpflanzen ins Gewächshaus überführt und hier kultiviert. Nach zwei Vegetationsperioden wurde die Sublinie N 282-6 als signifikant kleiner ermittelt ($p = 0,04$). Nach einer weiteren Vegetationsperiode waren die Pflanzen der Linie N 282-6 nicht mehr signifikant kleiner als die nicht-transgenen Kontrollpflanzen ($p = 0,64$), allerdings war hier der Stichprobenumfang von sechs auf zwei Pflanzen reduziert. Alle anderen Sublinien zeigten keine signifikanten Veränderungen (Tab. 3.33, Abb. 3.53).

Tab. 3.33: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linie N 282 im Gewächshaus

Die Gesamthöhen der Pappeln wurden nach 20- bzw. 31-monatiger Kultivierung erhoben. Eine signifikante Mittelwertabweichung wurde bei $p \leq 0,05$ angenommen. Da der Stichprobenumfang von N 282-3 und N 282-5 am Ende der dritten Vegetationsperiode auf ein einzelnes Individuum reduziert war, konnte hier keine Irrtumswahrscheinlichkeit berechnet und Signifikanz abgeleitet werden.

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standardabweichung [cm]	p	Signifikanz
20 Monate Kultur, zwei Vegetationsperioden						
Kontrollen	5	321	323	25		
N 282-2	4	332	350	49	0,74	nein
N 282-5	4	321	313	26	0,98	nein
N 282-6	6	246	235	58	0,04	ja, signifikant kleiner
31 Monate Kultur, drei Vegetationsperioden						
Kontrollen	5	411	409	16		
N 282-2	2	378	378	67	0,70	nein
N 282-5	1	359	359	0	-	nicht berechnet
N 282-6	2	384	384	44	0,64	nein

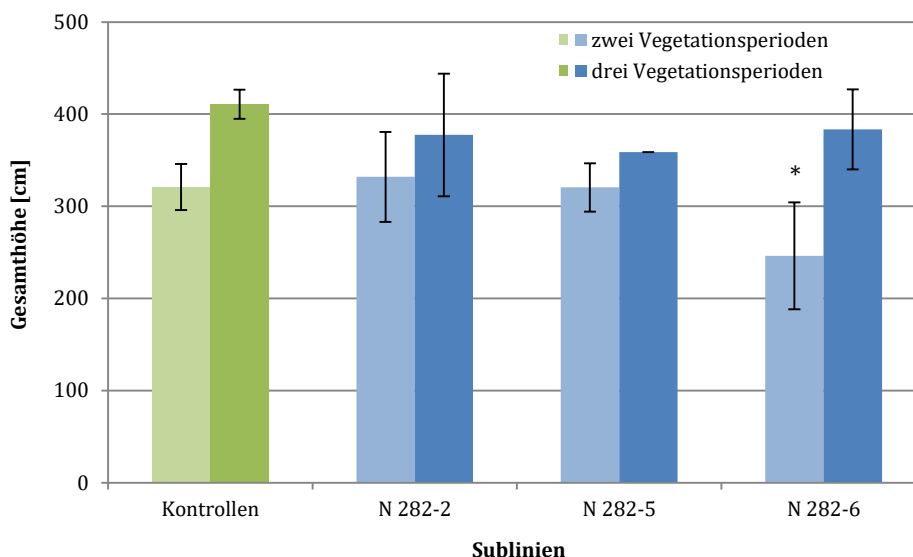


Abb. 3.53: Mittelwertvergleich der Gesamthöhenmessungen von N 282

Die Messdaten wurden nach zwei und drei Wachstumsperioden erhoben. Die nach zwei Vegetationsperioden signifikant abweichende Linie N 282-6 ($p = 0,04$) ist mit * markiert. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an. Für die Linie N 282-5 konnte nach drei Vegetationsperioden aufgrund des reduzierten Stichprobenumfangs keine Standardabweichung berechnet werden.

Holzchemische Analysen

Sechs ausgewählte Individuen, die über 19 Monate im Gewächshaus angezogen wurden, wurden nach Abschluss der zweiten Vegetationsperiode zur biochemischen Untersuchung der Biomasse an das Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung (Potsdam, K. Hettrich) übergeben: 14210, 14211 und 14212 (N 282-3) sowie 14125, 14126 und 14156 (nicht-transgene Kontrollpflanzen). Die Holzuntersuchung ergab, dass die transgene Linie N 282-3 einen signifikant höheren Anteil an Ethanol-Extraktstoffen beinhaltete. Der Wert war gegenüber den Kontrollen um 3,3% erhöht (Tab. 3.34).

Tab. 3.34: Prozentuale chemische Zusammensetzung des Sprossgewebes von drei Individuen der Linie N 282-3

Die Mittelwerte der einzelnen Bestandteile entsprachen etwa den Mittelwerten der nicht-transgenen Kontrollpflanzen. Eine signifikante Abweichung ($p \leq 0,05$) lag lediglich bei den Ethanol-Extraktstoffen vor (mit * markiert). Der Wert lag 3,3% höher als bei den nicht-transgenen Kontrollen. Die Analysen wurden am Fraunhofer IAP durchgeführt (K. Hettrich). Abkürzungen: M - Mittelwert, s - Standardabweichung, p - Irrtumswahrscheinlichkeit für signifikante Abweichung.

Bestandteile	N 282-3			Nicht-transgene Kontrollen	
	M	s	p	M	s
Asche	2,4	0,1	0,27	2,6	0,1
Protein	2,1	0,3	0,17	4,5	1,6
Ethanol-Extraktstoffe	18,5	0,5	0,03 *	15,2	1,0
Cellulose	32,5	0,1	0,25	34,5	1,8
Hemicellulose	20,8	0,3	0,95	20,8	0,6
Lignin	17,3	0,3	0,75	17,2	0,3

3.2.2.2 Herunterregulation

Zum *Knockdown* von Potri.002G034400 wurden fünf unterschiedliche Transformationsvektoren verwendet: A199 (N 315), A210 (N 357), A226 (N 369), A229 (N 372) und A227 (N 399). Alle Vektoren kodierten für dasselbe Zielgen, allerdings wurden die Vektoren mit unterschiedlichen Rückgraten konstruiert, bei denen auf miRNA319 und miRNA408 nach Shi *et al.* (2010) zurückgegriffen wurde: A199 und A226 enthielten die miRNA319 aus *A. thaliana*, A210, A227 und A229 die miRNA408 aus *P. × canescens*. Ein konsistenter Unterschied wurde hier nicht beobachtet. Zur Selektion wurde in allen Vektoren die Kanamycinresistenz *NPTII* verwendet. Alle Transformationen sind mit dem *P. × canescens*-Klon P1 durchgeführt worden.

Molekulargenetische Untersuchungen

Der Transformationserfolg wurde auf molekulargenetischer Ebene überprüft, wie im Folgenden exemplarisch für N 399 dargestellt, indem die Anwesenheit des Selektionsmarkers (Abb. 3.54) und des Zielgens (Abb. 3.55) nachgewiesen wurden.

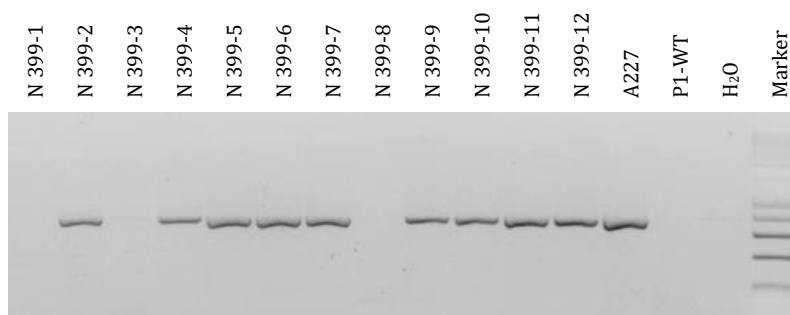


Abb. 3.54: Gelelektrophoretischer Nachweis des Selektionsmarkers *NPTII*

Die PCR wurde mit den Primern #343 und #344 bei einer *Annealing*-Temperatur von 60 °C und mit 40 Amplifikationszyklen durchgeführt. 5 µL der PCR-Produkte wurden auf einem 1,5% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. In N 399-1, -3 und -8 wurde das Resistenzgen nicht nachgewiesen; die übrigen neun überprüften Sublinien enthielten das Resistenzgen.

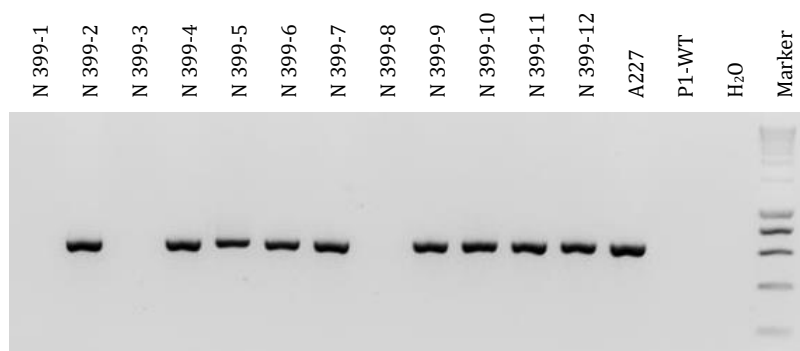


Abb. 3.55: Gelelektrophoretischer Nachweis des Zielgens

Die PCR wurde mit den Primern #1368 und #1369 bei einer *Annealing*-Temperatur von 53 °C und mit 38 Amplifikationszyklen durchgeführt. 5 µL der PCR-Produkte wurden auf einem 1,5% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. In N 399-1, -3 und -8 wurde das Zielgen nicht nachgewiesen; die übrigen neun überprüften Sublinien enthielten das Zielgen.

Insgesamt wurden aus allen fünf Transformationen 56 putativ transgene Regenerate herangezogen. 44 davon beinhalteten das Kanamycin-Resistenzgen und 43 das Zielgen (Tab. 3.35). Nach der folgenden Quantifizierung der Kopienzahlen wurden kapazitätsbedingt einzelne Sublinien zur weiteren Bearbeitung ausgewählt, sodass nicht alle Linien weiter untersucht wurden.

Tab. 3.35: Nachweis des Transformationserfolgs zur Überexpression von Potri.002G034400

Linie	Putativ transgene Regenerate	Sublinien mit nachgewiesenem Selektionsmarker	Sublinien mit nachgewiesenem Zielgen
N 315	4	4	4
N 357	10	9	8
N 369	15	13	12
N 372	15	9	10
N 399	12	9	9

Zur Quantifizierung der Kopienanzahl, mit der die T-DNA der Transformationsvektoren in den einzelnen Sublinien vorlag, wurden Southern Blots durchgeführt, wie beispielhaft für N 399 gezeigt (Abb. 3.56). Insgesamt lagen in 24 Sublinien eine Kopie der T-DNA vor, in sechs Sublinien zwei Kopien, in fünf Sublinien drei Kopien und in drei Sublinien vier Kopien. In jeweils einer Sublinie wurden fünf und sieben Kopien detektiert (Tab. 3.36).

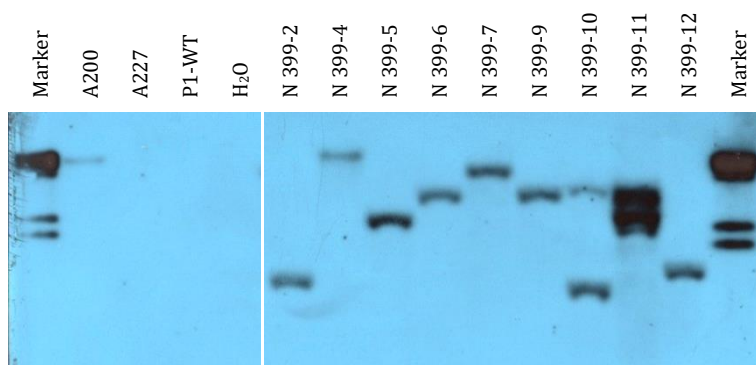


Abb. 3.56: Southern Blot zur Quantifizierung der Kopienanzahl in N 399

Die DNA für dieses Southern Blot wurde mit *SspI* restringiert. Die Digoxigenin-markierte Sonde bindet im Markergen *NPTII* und wurde mit den Primern #317 und #318 synthetisiert. Die Sonde band nicht wie vorgesehen bei A227, allerdings in der zusätzlich aufgetragenen Positivkontrolle A200, die ebenfalls eine Kanamycinresistenz beinhaltet. Die Sonde ist 780 bp lang. Als Fragmentlängenmarker wurde der DIG-Marker II (Fa. Roche, Mannheim) verwendet. Die Linie N 399-10 enthielt zwei Kopien der T-DNA, N 399-11 drei Kopien und alle weiteren untersuchten Sublinien jeweils eine Kopie.

Tab. 3.36: Ermittelte Kopienzahlen in unabhängigen transgenen Linien von N 399, N 315, N 357, N 369 und N 372

Per Southern Blot-Analyse wurden die Kopienzahlen der T-DNA von A199 (N 315), A210 (N 357), A226 (N 369), A229 (N 372) und A227 (N 399) im Pappelgenom quantifiziert. Aus der Transformation N 315 gingen sechs putativ transgene Sublinien hervor. Da die Sublinien N 315-3, -5 und -6 zunächst abzusterben schienen, wurden von diesen Klonen zusätzliche Regenerationsduplikate herangezogen, die mit „b“ gekennzeichnet wurden. N 315-6 starb im weiteren Bearbeitungsverlauf tatsächlich ab. Per PCR und anschließender Gelelektrophorese wurde die Anwesenheit des Selektionsmarkers *NPTII* überprüft. Die Linien N 315-1, -3, -4, -5 sowie die Replikationsduplikate N 315-3b und -5b enthielten das Resistenzgen. Die Linien N 315-2 und -6b wiesen das Resistenzgen *NPTII* nicht auf und wurden verworfen. In N 357-2 konnte keine Kopie der T-DNA nachgewiesen werden.

Kopienzahlen der T-DNA	Transgene Linien	
1	N 315-1, -3b N 357-1, -4, -14 N 369-1, -2, -3, -5, -9, -10, -12, -13, -14	N 372-5, -6, -8 N 399-2, -4, -5, -6, -7, -9, -12
2	N 357-3, -7 N 369-7	N 372-3, -7 N 399-10
3	N 315-5b N 357-15	N 372-1, -4 N 399-11
4	N 357-12	N 369-4, -8
5	N 357-5	
7	N 357-6	

Zur Ermittlung der T-DNA-Integrationsorte und zur Prüfung von möglichen Positionseffekten wurden für mehrere Sublinien von N 399 und N 369 TAIL-PCRs mit 128-fach bzw. 256-fach degenerierten Primern durchgeführt. In N 399 wurde die T-DNA über die *Left Border* hinaus amplifiziert, während in N 369 über die *Right Border* hinaus amplifiziert wurde. Die genomischen Bereiche außerhalb der T-DNA wurden mit einer *BLAST*-Analyse in *P. trichocarpa* und *P. × canescens* detektiert (<https://phytozome.jgi.doe.gov>, <http://aspensdb.uga.edu/spta717/Blast>, Zugriff am 06.04.2016). Die identifizierten Bereiche sind in Tab. 3.37 zusammengefasst. In den Sublinien N 399-4 und N 399-12 konnte der Integrationsort auch nach mehrfachen Versuchen nicht identifiziert werden.

Tab. 3.37: Identifizierte Integrationsorte der T-DNA in den Sublinien von N 399 und N 369

Die Integrationsorte wurden durch eine BLAST-Analyse in den Datenbanksequenzen von *P. trichocarpa* (*Pt*, Version 3.0) und *P. × canescens* (*Pc*, Version 1.1) ermittelt. Die Angaben zu den funktionellen Annotierungen der Loci basieren auf *P. trichocarpa*. Farblich hinterlegt sind die Linien mit signifikant abweichender Gesamthöhe. Für N 369-4 wurden weitere Sequenzen erhalten, die allerdings in *Pt* und *Pc* nicht zugeordnet werden konnten, ebenso wenig in den NCBI-Sequenzdatenbanken (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Zugriff am 06.04.2016). Soweit nicht anders vermerkt enthielten alle Linien eine Kopie der T-DNA.

Sublinie	Integrationsort	Datenbank-Art	Score <i>Pt</i> (<i>Pc</i>)	E-Wert <i>Pt</i> (<i>Pc</i>)	Funktionelle Annotierung des Integrationslocus
N 399-2	Chromosom 13	<i>Pt, Pc</i>	203,3 (220)	2,7E-51 (1E-56)	Potri.013G081400 (Exon)
N 399-5	Chromosom 11	<i>Pt, Pc</i>	244,7 (243)	2,4E-63 (8E-63)	Potri.011G102500 (Exon)
N 399-6	Chromosom 10	<i>Pt, Pc</i>	435,9 (464)	5,9E-121 (1E-129)	Potri.010G146500 (Exon)
N 399-7	Chromosom 13	<i>Pt, Pc</i>	230,3 (248)	2,9E-59(9E-65)	Potri.013G113900 (Intron)
N 399-9	Chromosom 4	<i>Pt, Pc</i>	145,6 (156)	4,5E-34 (3E-37)	ohne funktionelle Annotierung
N 399-10	Chromosom 15 (2 Kopien)	<i>Pt, Pc</i>	192,4 (198)	5E-48 (7E-50)	ohne funktionelle Annotierung
N 399-11	Chromosom 6	<i>Pt, Pc</i>	731,7 (754)	0,0 (0,0)	Potri.006G278000 (Exon)
N 369-1	Chromosom 9	<i>Pt, Pc</i>	147,4 (324)	2,3E-34 (4E-87)	Potri.009G063700 (kodierend)
N 369-2	Chromosom 11	<i>Pt, Pc</i>	1492,7 (1700)	0,0 (0,0)	Potri.011G044200 (Intron)
N 369-3	Scaffold 437	<i>Pt, Pc</i>	304,3 (353)	2,4E-81 (3E-96)	ohne funktionelle Annotierung
N 369-4 (4 Kopien)	Chromosom 14	<i>Pt, Pc</i>	558,5 (564)	1,1E-157 (2E-159)	ohne funktionelle Annotierung
	Chromosom 12	<i>Pt, Pc</i>	814,6 (806)	0,0 (0,0)	Potri.012G122700 (Intron)
	Chromosom 13	<i>Pt</i>	71,6	8,9E-12	Potri.013G079600 (Intron)
N 369-5	Chromosom 1	<i>Pt, Pc</i>	51,8 (52,8)	6E-9 (6E-7)	ohne funktionelle Annotierung
N 369-7 (2 Kopien)	Chromosom 17/12	<i>Pt</i>	Beide 197,9	Beide 6,6E-49	Beide ohne funktionelle Annotierung
N 369-9	Ein kleines Sequenzfragment wurde auf zehn unterschiedlichen Chromosomen in der Datenbanksequenz von <i>Pt</i> gefunden. Daher war keine eindeutige Klärung möglich.				
N 369-10	Chromosom 2	<i>Pt, Pc</i>	591,0 (586)	2E-167 (5E-166)	Potri.002G056500 (5' UTR)
N 369-12	Chromosom 12	<i>Pt</i>	107,7	1,1E-22	ohne funktionelle Annotierung

Für das Gen Potri.013G081400 lagen keine funktionellen Annotierungen vor. Es wurde eine PWWP-Domäne identifiziert, die an Histon-4 methyliertem Lysin-20 (H4K20me) bindet. Dies deutete darauf hin, dass dies ein Methyllysin-Erkennungsmotiv ist (<https://phytozome.jgi.doe.gov>, Zugriff am 06.04.16).

Das Gen Potri.011G102500 betreffend lagen in *P. trichocarpa* keine funktionellen Annotierungen vor, allerdings war die Sequenz ähnlich einem Homolog einer Mitogen-aktiviertem Proteinkinase (EC 2.7.11.24) aus *Medicago sativa* L. (<https://phytozome.jgi.doe.gov>, Zugriff am 06.04.16).

Bei Potri.010G146500 handelte es sich um ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (PANTHER-Datenbank), dem drei EC-Codes zugeordnet waren. Anhand der drei EC-Codes 2.3.2.23, 2.3.2.27 und 6.2.1.45 ließ sich eine katalytische Aktivität im Zusammenhang mit Ubiquitin ableiten (<https://phytozome.jgi.doe.gov>, <http://enzyme.expasy.org>, Zugriff am 06.04.2016).

Das Gen Potri.013G113900 war als Histidinol-Phosphattransaminase annotiert. Das Enzym trug den EC-Code 2.6.1.9, der Aminotransferasen charakterisiert. Aminotransferasen sind im Aminosäurekatabolismus beteiligt und katalysieren den Transfer von α -Aminogruppen auf α -Ketosäuren (Stryer 1995, <https://phytozome.jgi.doe.gov>, Zugriff am 06.04.16).

Das Gen Potri.006G278000 kodiert für ein Protein mit unbekannter Funktion. Die Sequenz wies Ähnlichkeit zu DUF599 von *Arabidopsis spec.* auf, einem Protein mit ebenfalls unbekannter Funktion (<https://phytozome.jgi.doe.gov>, Zugriff am 06.04.16).

Für das Gen Potri.009G063700 lagen in der Sequenzdatenbank für *P. trichocarpa* keinerlei funktionellen Annotationen vor (<https://phytozome.jgi.doe.gov>, Zugriff am 09.12.15).

Das Gen Potri.011G044200 kodiert mit dem Pfam-Code PF03619 für eine Domäne, die charakteristisch für Transmembran-Transportproteine ist (<https://phytozome.jgi.doe.gov>, Zugriff am 09.12.15). Sie transportieren Brassinosteroid-Substanzen und dienen als Regulatoren für den programmierten Zelltod (Malinovsky *et al.* 2010, <https://pfam.xfam.org/family/PF03619?type=Family>, Zugriff am 30.01.16).

Hinter Potri.012G122700 verbarg sich ein Enzym mit dem Code EC 3.4.25.1 (<https://phytozome.jgi.doe.gov>, Zugriff am 09.12.15). Diese Enzyme gehören zum Proteasom einer Zelle und katalysieren die Restriktion von Peptidbindungen (<http://enzyme.expasy.org>, Zugriff am 30.01.16).

Das Gen Potri.013G079600 wurde als „Transducin Beta-like Protein 3“ beschrieben. Die PFAM-Datenbank ermittelte sieben WD-Proteindomänen und eine WD40-assoziierte Domäne (<https://phytozome.jgi.doe.gov>, Zugriff am 10.05.16). Proteine aus der WD40-Familie sind in allen Eukaryoten vorhanden. Sie haben regulative Funktionen auf Zellebene, beispielsweise für mRNA-Modifikation, Transkription oder Zellteilung (Neer *et al.* 1994).

Im Gen Potri.002G056500 wurden zwei Proteindomänen identifiziert: Eine BTB/POZ-Domäne, die eine strukturelle Domäne zur Dimerisierung ist (Bardwell & Treisman 1994), und eine NPR1/NIM1-Domäne, die der Zellabwehr zugeschrieben wird (Caldwell & Michelmore 2009). Eine Annotation war für Potri.002G056500 allerdings nicht vorhanden (<http://phytozome.jgi.doe.gov>, Zugriff am 09.12.15).

Die ermittelten Phänotypen waren zum großen Teil signifikant. Auffällig war die Linie N 369-10, die im Gegensatz zu allen anderen signifikanten Linien kleiner war als die Kontrollpflanzen. In dieser Linie war ein regulativer Bereich eines Gens betroffen, das der Zellabwehr zugeordnet wurde. Betreffend die anderen Linien wurden keine Integrationsorte identifiziert, wodurch die auffälligen Phänotypen auf einen Positionseffekt zurückgeführt werden könnten.

Expressionsanalysen

Per qRT-PCR wurde die Expression des Zielgens Potri.002G034400 in der Linie N 399 untersucht. In den zwei Linien N 399-2 (Ct = 32,6) und -4 (Ct = 32,9) war die Expression deutlich herabreguliert, leicht herabreguliert in N 399-5, -7 und -9 (Ct = 28,6 bis Ct = 28,8). Die Linie N 399-11 (Ct = 27,8) entsprach in ihrer Expression dem *Calibrator* P1-WT (Ct = 27,7). Der Ct-Wert einer Linie (N 399-12) lag über dem *Calibrator* (Ct = 24,3, Abb. 3.57).

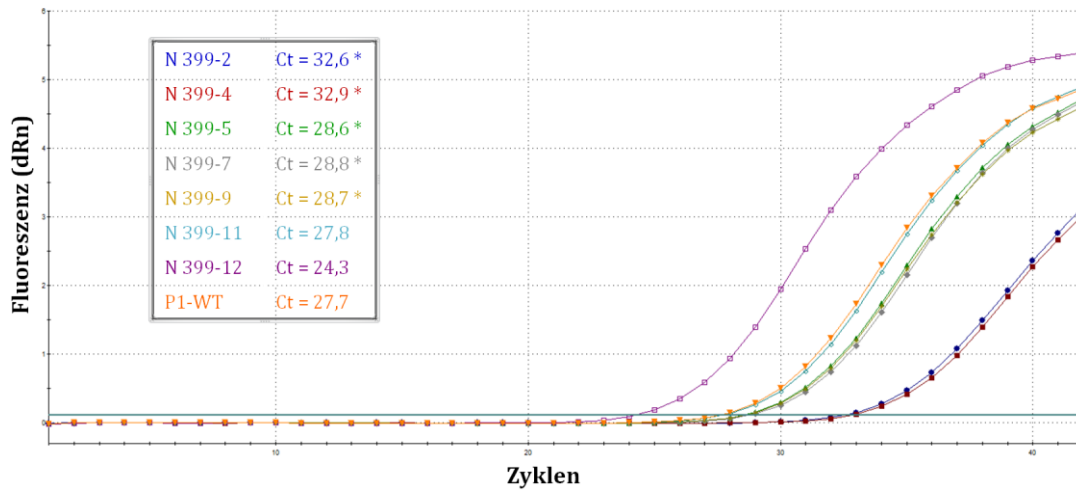


Abb. 3.57: Expressionsanalyse per qRT-PCR von ausgewählten N 399-Sublinien

Die Expression des Zielgens *Potri.002G034400* ist im Spross der Linien N 399-2, -4, -5, -7 und -9 nachweislich herabreguliert (markiert mit *). Normalisiert wurden die Daten gegen das Haushaltsgen *PcUBQ*. Während der PCR wurde nur ein Amplikon gebildet (Schmelzkurve nicht gezeigt).

Per qRT-PCR wurde die Expression des Zielgens *Potri.002G034400* ebenfalls in N 369 untersucht. Das Expressionsniveau des Gens in den vier getesteten Sublinien N 369-3, -5 und -9 war herabreguliert (Ct = 29,9 bis Ct = 31,2), in N 369-12 sogar besonders stark (Ct = 34,0). Im P1-WT betrug der Ct-Wert 27,8 (Abb. 3.58).

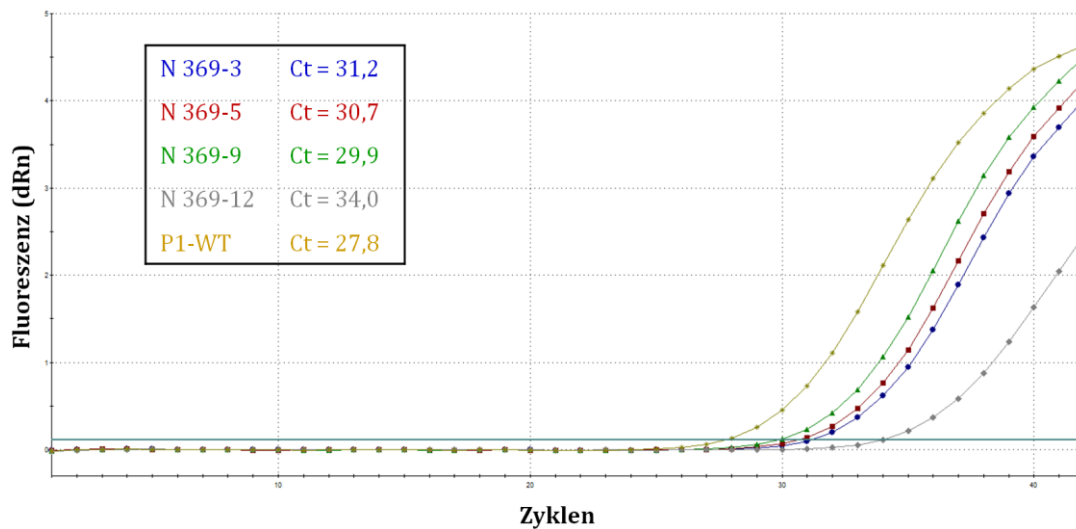


Abb. 3.58: Expressionsanalyse per qRT-PCR von ausgewählten N 369-Sublinien

Die Expression des Zielgens *Potri.002G034400* war im Spross der Linien N 369-3, -5, -9 und -12 nachweislich herabreguliert. Normalisiert wurden die Daten gegen das Haushaltsgen *PcUBQ*. Während der PCR wurde nur ein Amplikon gebildet (Schmelzkurve nicht gezeigt).

Phänotypisierung

Zur Analyse der Pflanzen unter naturnahen Bedingungen außerhalb der Gewebekultur wurden zahlreiche Pflanzen von ausgewählten Sublinien zusammen mit nicht-transgenen Kontrollpflanzen ins Gewächshaus überführt und hier kultiviert.

Nach zwei und 14 Monaten Kultivierung wurde die Gesamthöhe der Pflanzen von N 399 gemessen. Die Sublinien N 399-2, -7, -9 und -11 wurden nach 14-monatiger Kultivierung als signifikant kleiner als die Kontrollpflanzen ermittelt ($p \leq 0,05$, Tab. 3.38, Abb. 3.59).

Tab. 3.38: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linie N 399 im Gewächshaus

Die Gesamthöhen der Pappeln wurden nach zwei- und 14-monatiger Kultivierung erhoben. Während nach zwei Monaten noch keine signifikanten Mittelwertänderungen festzustellen waren, waren die Sublinien N 399-2, -7, -9 und -11 nach 14 Monaten signifikant kleiner ($p \leq 0,05$) als die nicht-transgenen Kontrollen. Da die Überführung im September, also kurz vor Ende der Vegetationsperiode stattfand, wurden die Pflanzen in einem beheizten Gewächshaus überwintert, sodass ihre Vegetationsperiode im Winter nicht beendet wurde.

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standardabweichung [cm]	p	Signifikanz
2 Monate Kultur						
Kontrollen	9	41	41	14		
N 399-2	10	40	43	10	0,87	nein
N 399-4	10	43	42	7	0,67	nein
N 399-6	9	51	48	8	0,11	nein
N 399-7	6	33	34	8	0,20	nein
N 399-9	11	41	39	6	0,96	nein
N 399-10	8	42	40	7	0,88	nein
N 399-11	9	31	29	12	0,16	nein
14 Monate Kultur, ohne Unterbrechung der Vegetationsperiode						
Kontrollen	9	206	202	8		
N 399-2	10	164	184	55	0,05	ja, signifikant kleiner
N 399-4	10	178	208	52	0,15	nein
N 399-6	9	201	211	35	0,75	nein
N 399-7	6	148	153	43	0,05	ja, signifikant kleiner
N 399-9	11	177	190	30	0,01	ja, signifikant kleiner
N 399-10	8	184	198	35	0,15	nein
N 399-11	9	138	136	45	0,00	ja, signifikant kleiner

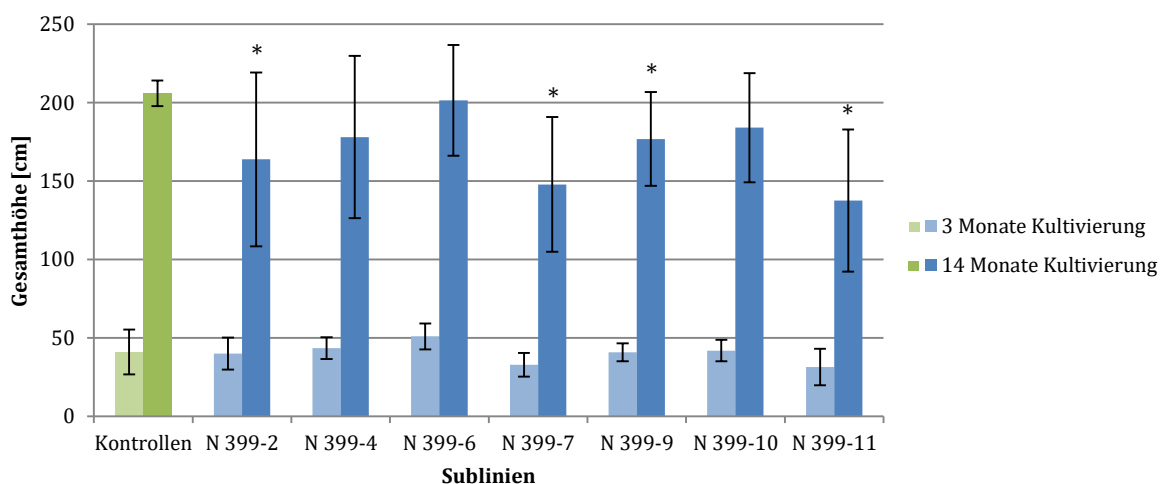


Abb. 3.59: Mittelwertvergleich der Gesamthöhenmessungen von N 399

Der Mittelwert der Kontrollen war größer als bei den einzelnen Sublinien. Vier der sieben transgenen Sublinien waren nach 14 Monaten signifikant kleiner als die Kontrollen ($p \leq 0,05$, mit * markiert). Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an.

Nach siebenmonatiger Kultivierung wurde die Gesamthöhe der Pappeln von N 357 gemessen. Signifikante Mittelwertabweichungen ($p \leq 0,05$) wurden nicht ermittelt, ebenso keine weiteren Phänotypänderungen. Nach weiterer elfmonatiger Kultivierung (Gesamtkultivierung 18 Monate) wurden die drei Linien N 357-3, -5 und -15 als signifikant kleiner ermittelt, N 357-14 als signifikant größer (Tab. 3.39, Abb. 3.60).

Tab. 3.39: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linie N 357 im Gewächshaus

Die Gesamthöhen der Pappeln wurden nach sieben- bzw. 18-monatiger Kultivierung erhoben. Signifikante Mittelwertabweichungen waren nach der ersten Vegetationsperiode nicht zu beobachten. Nach der zweiten Vegetationsperiode wurden vier Sublinien als signifikant abweichend ermittelt ($p \leq 0,05$).

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standardabweichung [cm]	p	Signifikanz
7 Monate Kultur, eine Vegetationsperiode						
Kontrollen	10	92	89	16		
N 357-1	15	93	97	17	0,86	nein
N 357-3	14	89	99	25	0,74	nein
N 357-4	5	101	104	7	0,15	nein
N 357-5	12	80	88	15	0,11	nein
N 357-6	11	89	94	13	0,78	nein
N 357-14	12	98	100	13	0,47	nein
N 357-15	8	81	94	23	0,30	nein
18 Monate Kultur, zwei Vegetationsperioden						
Kontrollen	8	257	254	15		
N 357-1	11	228	246	54	0,13	nein
N 357-3	11	218	229	45	0,03	ja, signifikant kleiner
N 357-4	2	216	216	14	0,17	nein
N 357-5	12	201	215	55	0,00	ja, signifikant kleiner
N 357-6	8	250	253	27	0,57	nein
N 357-14	5	277	275	2	0,01	ja, signifikant größer
N 357-15	8	219	240	50	0,00	ja, signifikant kleiner

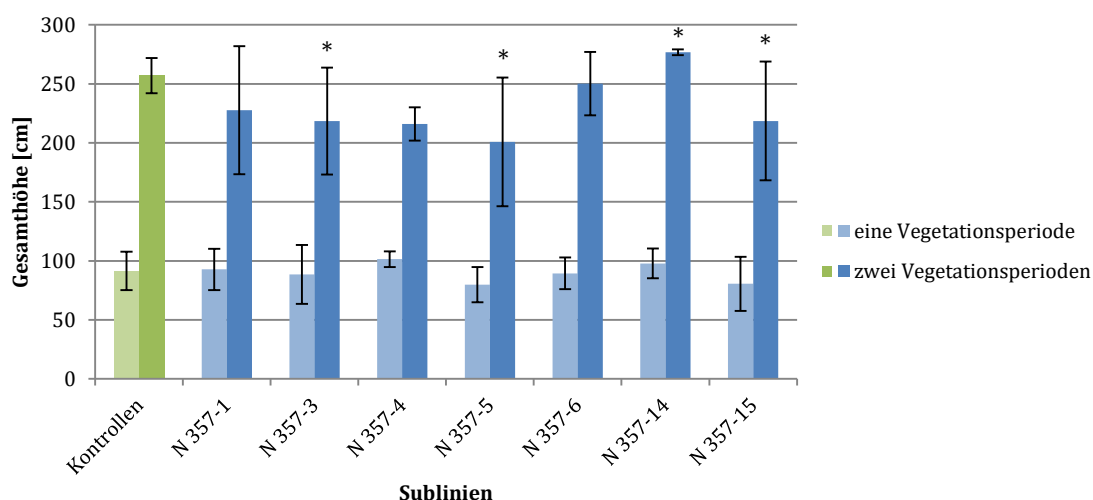


Abb. 3.60: Mittelwertvergleich der Gesamthöhenmessungen von N 357

Signifikant abweichende Linien ($p \leq 0,05$) wurden nach einer Vegetationsperiode nicht beobachtet. Nach der zweiten Vegetationsperiode waren die Linien N 357-3, -5, -14 und -15 signifikant abweichend. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an.

Die herangezogenen Pappeln von N 369 wurden nach sieben Monaten, nach Abschluss der ersten Vegetationsperiode, und nach 17 Monaten, nach Abschluss der zweiten Vegetationsperiode, vermessen (Tab. 3.40). Mehrere Sublinien der Transformationslinie N 369 zeigten einen besonderen Phänotyp mit veränderter Gesamthöhe: Nach sieben Monaten waren bereits die Linien N 369-1, -2, -4, -7 und -14 signifikant größer, nach Abschluss der zweiten Vegetationsperiode zudem die Linien N 369-9 und -12 ($p \leq 0,05$) (Abb. 3.61 und 3.62). N 369-10 wurde sowohl bei der ersten Messung als auch bei der zweiten Messung als signifikant kleiner identifiziert ($p = 0,00$). Bei den Sublinien N 369-3 und -5 sowie N 369-13 wurde kein signifikanter Unterschied zwischen transgenen Pflanzen und nicht-transgenen Kontrollpflanzen beobachtet ($p > 0,05$). N 369-13 und -14 wurden aus Kapazitätsgründen nach der ersten Vegetationsperiode nicht weiter kultiviert.

Tab. 3.40: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linie N 369 im Gewächshaus

Die Gesamthöhen der Pappeln wurden nach sieben und 17 Monaten erhoben. Insgesamt sieben Linien waren signifikant größer ($p \leq 0,05$), eine Linie signifikant kleiner als die nicht-transgenen Kontrollen. Die Sublinien N 369-13 und -14 wurden nach der ersten Vegetationsperiode nicht weiter kultiviert.

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standardabweichung [cm]	p	Signifikanz
7 Monate Kultur, eine Vegetationsperiode						
Kontrollen	16	92	98	18		
N 369-1	9	117	114	19	0,01	ja, signifikant größer
N 369-2	11	108	102	18	0,05	ja, signifikant größer
N 369-3	9	83	81	29	0,46	nein
N 369-4	9	107	112	12	0,04	ja, signifikant größer
N 369-5	9	105	111	24	0,21	nein
N 369-7	7	117	120	15	0,01	ja, signifikant größer
N 369-9	4	106	105	20	0,32	nein
N 369-10	7	46	49	12	0,00	ja, signifikant kleiner
N 369-12	10	104	106	15	0,09	nein
N 369-13	3	69	78	32	0,42	nein
N 369-14	11	52	47	19	0,00	ja, signifikant größer
17 Monate Kultur, zwei Vegetationsperioden						
Kontrollen	10	199	207	28		
N 369-1	7	275	277	10	0,00	ja, signifikant größer
N 369-2	7	264	271	21	0,00	ja, signifikant größer
N 369-3	5	224	252	72	0,52	nein
N 369-4	8	265	265	10	0,00	ja, signifikant größer
N 369-5	8	235	274	64	0,20	nein
N 369-7	5	270	271	14	0,00	ja, signifikant größer
N 369-9	4	264	281	34	0,04	ja, signifikant größer
N 369-10	7	75	71	18	0,00	ja, signifikant kleiner
N 369-12	8	263	276	36	0,00	ja, signifikant größer

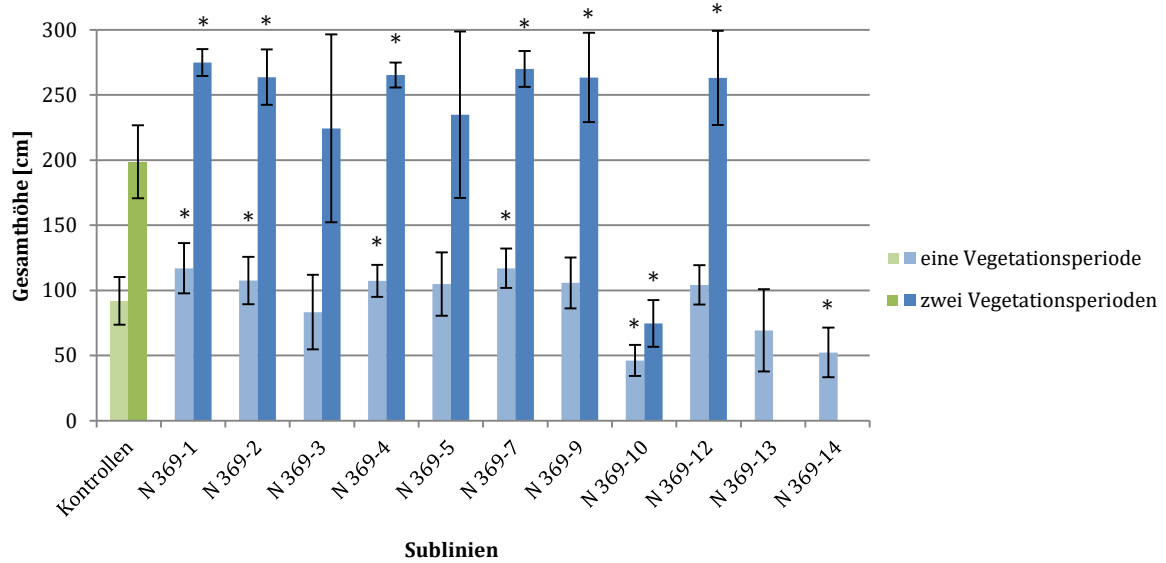


Abb. 3.61: Mittelwertvergleich der Gesamthöhenmessungen von N 369

Signifikant größer als die nicht-transgenen Kontrollen waren die Mittelwerte der Sublinien N 369-1, -2, -4, -7, -9 und -12 nach zwei Vegetationsperioden. Die Sublinie N 369-10 hatte nach einer und zwei Vegetationsperioden einen signifikant niedrigeren Mittelwert. Signifikant abweichende Linien ($p \leq 0,05$) sind mit * markiert. Die Linien N 369-13 und -14 wurden kapazitätsbedingt nach der ersten Vegetationsperiode nicht weiter kultiviert. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an.

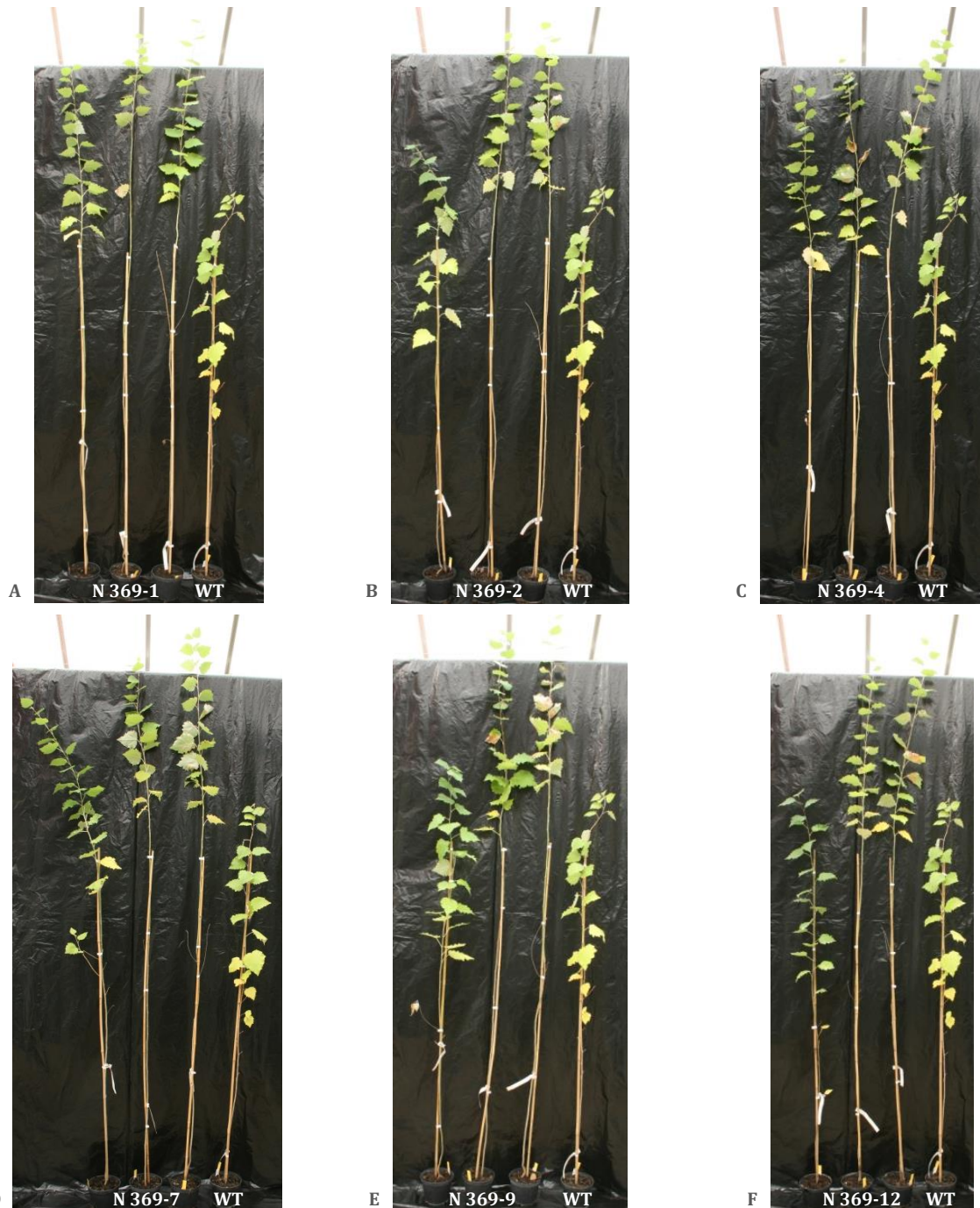


Abb. 3.62: Signifikant größere Pflanzen der Linie N 369

Die sechs abgebildeten Sublinien von N 369 wurden am Ende der zweiten Vegetationsperiode als signifikant größer als die nicht-transgenen Kontrollpflanzen identifiziert. Als Wildtyp ist in allen Abbildungen die mediane Kontrollpflanze dargestellt. Aufgrund der großen Höhe der Pappeln konnte im oberen Bereich kein schwarzer Hintergrund installiert werden.

Die Pappeln der Linie N 369-10 waren mit einem Mittelwert von 75 cm sowohl nach einer als auch nach zwei Vegetationsperioden signifikant kleiner als die nicht-transgenen Kontrollpflanzen mit einem Mittelwert von 199 cm ($p = 0,00$, Abb. 3.63 A). Darüber hinaus war die Morphologie der Blätter auffällig (Abb. 3.63 B).



Abb. 3.63: Auffälliger Phänotyp der Linie N 369-10

Die Linie N 369-10 war signifikant kleiner als die Kontrollpflanzen (A). Abgebildet sind die kleinste Pflanze der Sublinie (1), ihr berechneter Median (2) sowie die größte Pflanze (3). Die transgenen Pflanzen hatten zudem eine veränderte Blattmorphologie (B). Neben dem Wildtyp ist hier die größte Pflanze der Linie N 369-10 (3 aus Abb. 3.63 A) dargestellt.

Nach 15, 13 oder sieben Monaten wurde die Gesamthöhe der einzelnen Pflanzen von N 315 gemessen sowie nach sieben Monaten Kultivierung, am Ende der ersten Vegetationsperiode, die Gesamthöhe der Pappeln von N 372. Signifikante Mittelwertabweichungen ($p \leq 0,05$) wurden nicht festgestellt (Abb. 3.64 und 3.65).

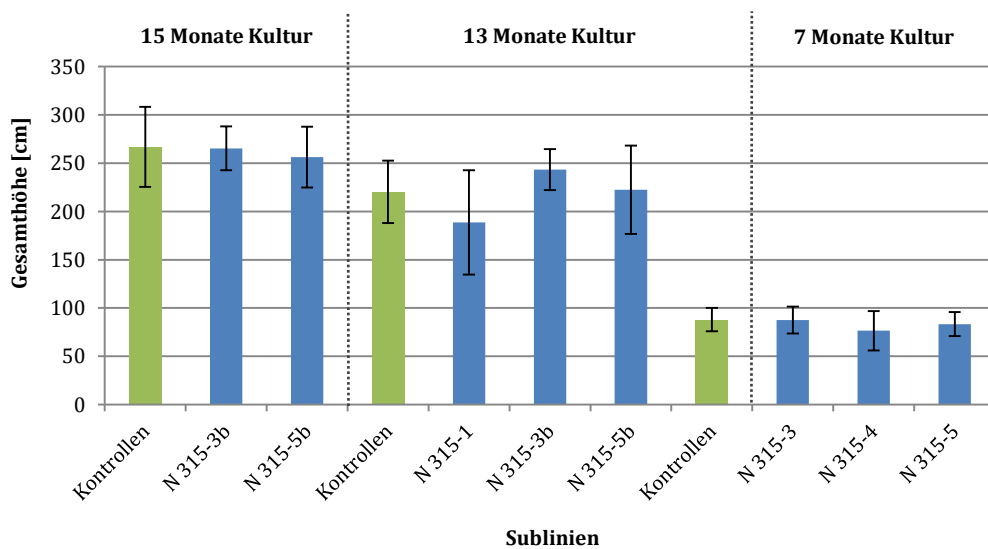


Abb. 3.64: Mittelwertvergleich der Gesamthöhenmessungen von N 315

Die Messdaten wurden nach 15, 13 bzw. sieben Monaten Kultur erhoben. Signifikant abweichende Linien ($p \leq 0,05$) wurden nicht beobachtet. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an.

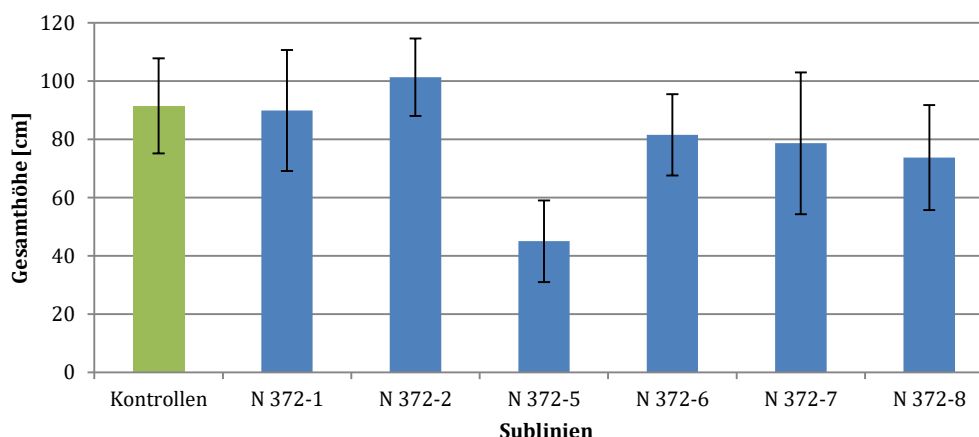


Abb. 3.65: Mittelwertvergleich der Gesamthöhenmessungen von N 372

Die Messdaten wurden am Ende der ersten Vegetationsperiode erhoben. Signifikante Mittelwertabweichungen ($p \leq 0,05$) wurden nicht beobachtet. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an. Trotz optischer Auffälligkeit war die Sublinie N 372-5 nicht signifikant abweichend ($p = 0,15$). Ihr Stichprobenumfang bestand allerdings lediglich aus zwei Pflanzen.

Holzchemische Analysen

Neun ausgewählte Pappeln, die über zwölf Monate im Gewächshaus angezogen wurden, wurden zur biochemischen Untersuchung der Biomasse an das Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung (Potsdam, K. Hettrich) übergeben: 17785, 17786 und 17787 (N 315-1), 17805, 17806 und 17807 (N 315-5b) sowie 17775, 17776 und 17777 (nicht-transgene Kontrollpflanzen). Die Holzuntersuchungen ergaben, dass die transgene Linie N 315-1 2,2% mehr Cellulose als die nicht-transgenen Kontrollpflanzen enthielt (Tab. 3.41). Alle übrigen analysierten Bestandteile waren unverändert, ebenfalls die Holzzusammensetzung von N 315-5b.

Tab. 3.41: Prozentuale chemische Zusammensetzung des Sprossgewebes der Linien N 315-1 und N 315-5b

Die Mittelwerte M der einzelnen Bestandteile wurden aus drei Individuen berechnet. Sie entsprachen etwa den Mittelwerten der nicht-transgenen Kontrollpflanzen. Eine signifikante Abweichung ($p \leq 0,05$) lag lediglich beim Cellulosegehalt von N 315-1 vor (mit * markiert). Der Wert lag 2,2% höher als bei den nicht-transgenen Kontrollen ($p = 0,03$). Die Analysen wurden am Fraunhofer IAP durchgeführt (K. Hettrich). Abkürzungen: M - Mittelwert, s - Standardabweichung, p - Irrtumswahrscheinlichkeit für signifikante Abweichung.

Bestandteile	Transgene Pflanzen der Linie N 315						Nicht-transgene Kontrollen	
	N 315-1			N 315-5b			M	s
	M	s	p	M	s	p	M	s
Asche	2,7	0,1	0,97	2,7	0,2	0,84	2,7	0,1
Protein	4,1	1,0	0,13	2,8	0,1	0,33	2,4	0,5
Ethanol-Extraktstoffe	18,2	0,5	0,19	18,4	1,5	0,30	20,3	1,5
Cellulose	34,5	0,3	0,03 *	32,6	1,0	0,72	32,3	0,7
Hemicellulose	20,1	0,6	0,32	21,5	0,6	0,18	20,7	0,3
Lignin	16,5	0,4	0,41	17,1	0,4	0,71	16,9	0,4

Für eine zweite Untersuchung wurden sechs ausgewählte Individuen, die über 18 Monate (inkl. eine Wintersaison) im Gewächshaus angezogen wurden, ebenfalls zur biochemischen Untersuchung der Biomasse an das Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung (Potsdam, K. Hettrich)

übergeben: 18927 und 18931 (beide N 369-1), 18957 und 18958 (beide N 369-4) sowie 18886 und 18887 (nicht-transgene Kontrollpflanzen). Die Holzuntersuchung ergab, dass die transgenen Linien geringfügig mehr Cellulose, mehr Glucan und mehr strukturelle Kohlenhydrate enthielten (Tab. 3.42). Signifikante Abweichungen ($p \leq 0,05$) wurden allerdings nicht festgestellt.

Tab. 3.42: Prozentuale chemische Zusammensetzung des Sprossgewebes der Linien N 369-1 und N 369-4

Die Mittelwerte M der einzelnen Bestandteile wurden aus zwei Individuen berechnet. Sie entsprachen etwa den Mittelwerten der nicht-transgenen Kontrollpflanzen, signifikante Abweichungen wurden nicht festgestellt. Die Analysen wurden am Fraunhofer IAP durchgeführt (K. Hettrich). Abkürzungen: M - Mittelwert, s - Standardabweichung, p - Irrtumswahrscheinlichkeit für signifikante Abweichung.

Bestandteile	Transgene Pflanzen der Linie N 369						Nicht-transgene Kontrollen	
	N 369-1			N 369-4			M	s
	M	s	p	M	s	p	M	s
Asche	1,8	0,0	0,36	1,8	0,0	0,28	2,0	0,1
Protein	1,2	0,1	0,31	1,2	0,0	0,21	1,3	0,1
Ethanol-Extraktstoffe	15,5	0,6	0,30	15,6	0,3	0,22	16,6	0,4
Cellulose	35,6	1,0	0,19	34,4	0,5	0,32	33,0	0,9
Hemicellulose	21,9	0,4	0,47	22,2	0,6	0,44	21,5	0,1
Lignin	18,9	0,3	0,91	19,7	0,2	0,31	19,0	0,4

3.2.3 Genetische Modifikation von Potri.019G084600

Das Gen Potri.019G084600 (ehemals POPTR_0019s11440) war auf dem Plus-Strang im Bereich 11.709.238-11.715.574 von Chromosom 19 kodiert. Es wies Ähnlichkeiten zu einem nicht näher charakterisierten Protein von *Arabidopsis thaliana* auf. In der bioinformatischen Datenbank „Protein Families“ (Abkürzung Pfam) wurde das Protein anhand seiner Domänen als Magnesiumtransporter annotiert (<https://phytozome.jgi.doe.gov>, Zugriff am 30.01.2016). Fünf mögliche Transkripte, die sich in der Anzahl der Exons und ihrer 5' UTR unterschieden, waren in der Datenbanksequenz von *P. trichocarpa* hinterlegt (Abb. 3.66, <https://phytozome.jgi.doe.gov>, Zugriff am 30.01.2016). Das Gen wurde nach den Daten des eFP-Browsers vor allem in den männlichen und weiblichen Kätzchen sowie dem Xylem exprimiert (<http://bar.utoronto.ca/efppop/cgi-bin/efpWeb.cgi>, Zugriff am 10.02.2016, Abb. 3.67).

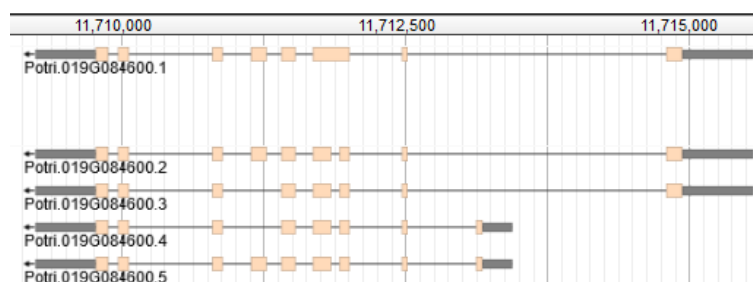


Abb. 3.66: Transkript-Modelle von Potri.019G084600

Für Potri.019G084600 lagen fünf unterschiedliche Transkriptmodelle in der Sequenzdatenbank Phytozome vor. Die Unterschiede bestanden in der Anzahl der Exons und in der Länge der 3' UTR (Quelle: <https://phytozome.jgi.doe.gov>, Zugriff am 30.01.2016).

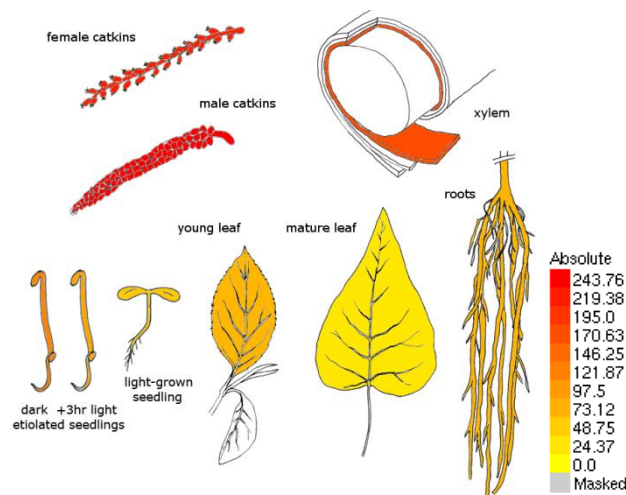


Abb. 3.67: Expressionsdaten der Transkripte von Potri.019G084600 in verschiedenen Pappelgeweben

Für alle fünf Transkripte wurden die gleichen Expressionsdaten ausgegeben (Quelle: <http://bar.utoronto.ca/efppop/cgi-bin/efpWeb.cgi>, Zugriff am 10.02.2016). Ihre Expression wurde vor allem in den Kätzchen und dem sich entwickelnden Xylem festgestellt.

Das Gen Potri.019G084600 wurde in vier Überexpressions- und *Knockdown*-Ansätzen genetisch modifiziert. Die genetischen Veränderungen, unabhängig davon, ob sie Überexpressions- oder *Knockdown*-Ansätze aufwiesen, führten lediglich in Einzelfällen zur Beobachtung von signifikant abweichender Pflanzhöhe. Der Anteil von Cellulose an der gesamten Biomasse war in einer von zwei untersuchten Sublinien erhöht.

3.2.3.1 Überexpression

Zur Überexpression von Potri.019G084600 wurde der Transformationsvektor A201 verwendet. Zur Selektion war der Vektor mit der Hygromycinresistenz *HPT* ausgestattet. Am 01.11.2012 wurde die Transformation N 322 durchgeführt, am 13.11.2012 die Transformation N 327. Empfängerorganismus war für beide Transformationen der *P. × canescens*-Klon P1.

Molekulargenetische Untersuchungen

Beide Linien wurden molekulargenetisch auf den Transformationserfolg untersucht, indem per PCR und anschließender Gelelektrophorese die Anwesenheit des Selektionsmarkers *HPT* (Abb. 3.68) und des Zielgens (Abb. 3.69) überprüft wurde, wie im Folgenden exemplarisch für N 322 dargestellt. Von insgesamt 16 putativ transgenen Regeneraten aus beiden Transformationen wurde der transgene Status in 15 Sublinien bestätigt.

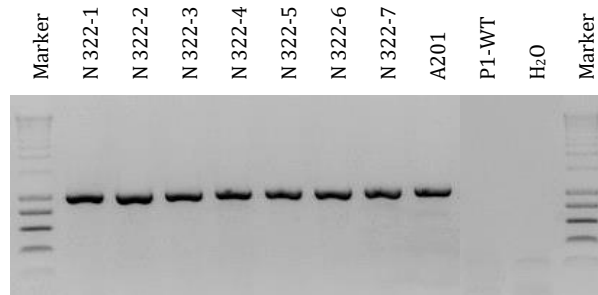


Abb. 3.68: Gelelektrophoretischer Nachweis des Selektionsmarkers *HPT*

Die PCR wurde mit den Primern #337 und #338 bei einer *Annealing*-Temperatur von 58 °C und mit 40 Amplifikationszyklen durchgeführt. 5 µL der PCR-Produkte wurden auf einem 1,3% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. Alle überprüften Sublinien enthielten das Resistenzgen.

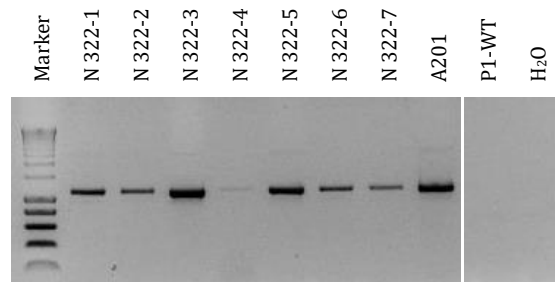


Abb. 3.69: Gelelektrophoretischer Nachweis des Zielgens

Die PCR wurde mit den Primern #1228 und #1361 bei einer *Annealing*-Temperatur von 53 °C und mit 35 Amplifikationszyklen durchgeführt. 5 µL der PCR-Produkte wurden auf einem 1,3% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. Alle getesteten Linien enthielten das Zielgen.

Per Southern Blot-Analyse wurde die Kopienanzahl quantifiziert, mit der die T-DNA von A201 in den einzelnen Sublinien vorlag, wie nachfolgend exemplarisch für N 322 gezeigt wird (Abb. 3.70). Insgesamt wurden Linien mit einer bis drei Kopien der T-DNA identifiziert (Tab. 3.43).

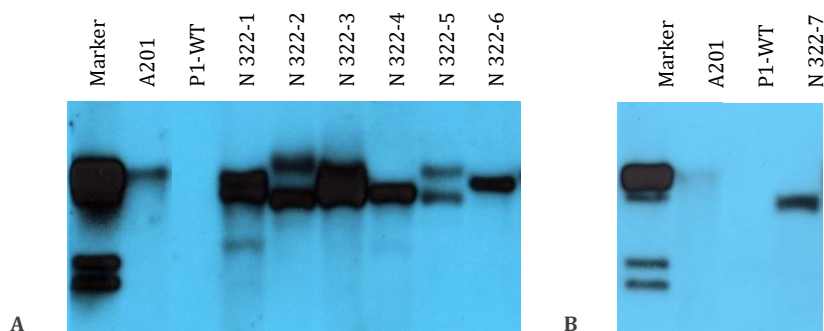


Abb. 3.70: Southern Blots zur Quantifizierung der Kopienzahl in N 322

Die DNA für dieses Southern Blot wurde mit *SacI* restringiert. Die Digoxigenin-markierte Sonde bindet im Markergen *HPT* und wurde mit den Primern #337 und #338 synthetisiert. Die Sonde ist 980 bp lang. Als Fragmentlängenmarker wurde der DIG-Marker II (Fa. Roche, Mannheim) verwendet.

Tab. 3.43: Ermittelte Kopienzahlen in unabhängigen transgenen Linien von N 322 und N 327

Per Southern Blot-Analyse wurden die Kopienzahlen der T-DNA von A201 im Pappelgenom quantifiziert. In N 327-6 und N 327-9 waren die Ergebnisse nicht eindeutig: Die Kopienanzahl wurde für N 327-6 auf eine bis zwei und für N 327-9 auf zwei bis drei festgelegt.

Kopienzahlen der T-DNA	Transgene Linien
1	N 322-6, -7 N 327-2, -4, -7, -8
1-2	N 327-6
2	N 322-2, -3, -4, -5 N 327-3, -5
2-3	N 327-9
3	N 322-1

Phänotypisierung

Zur Analyse der Pflanzen unter naturnahen Bedingungen außerhalb der Gewebekultur wurden zahlreiche Pflanzen von ausgewählten Sublinien von N 322 und N 327 zusammen mit nicht-transgenen Kontrollpflanzen ins Gewächshaus überführt.

Bis zur Vermessung nach der ersten Vegetationsperiode wurden die Pflanzen von N 322 für 13 bzw. elf Monate kultiviert. Die Pappeln der Linie N 322-5 waren signifikant höher als die nicht-transgenen Kontrollpflanzen (Tab. 3.44). Nur diese und die Kontrollpflanzen wurden weiterkultiviert. Nach einer Gesamtdauer von 25 Monaten wurden die Pflanzen erneut vermessen. Die signifikante Mittelwertabweichung von N 322-5 wurde anschließend nicht mehr bestätigt (Abb. 3.71).

Tab. 3.44: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linie N 322 im Gewächshaus

Die Gesamthöhen der Pappeln wurden nach Abschluss der ersten bzw. zweiten Vegetationsperiode erhoben. Eine signifikante Mittelwertabweichung ($p \leq 0,05$) wurde von Sublinie N 322-5 nach der ersten Vegetationsperiode erreicht ($p = 0,04$), die allerdings nach der zweiten Vegetationsperiode nicht bestätigt wurde ($p = 0,61$).

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standardabweichung [cm]	p	Signifikanz
13 Monate Kultur, eine Vegetationsperiode						
Kontrollen	10	259	259	22		
N 322-6	7	269	268	30	0,50	nein

Tab. 3.44: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linie N 322 im Gewächshaus (Fortsetzung)

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standardabweichung [cm]	p	Signifikanz
11 Monate Kultur, eine Vegetationsperiode						
Kontrollen	10	231	237	20		
N 322-1	7	238	233	28	0,61	nein
N 322-2	6	229	223	23	0,87	nein
N 322-5	6	253	246	15	0,04	ja, signifikant größer
N 322-7	4	224	232	25	0,69	nein
23 Monate Kultur, zwei Vegetationsperioden						
Kontrollen	10	345	371	64		
N 322-5	5	330	332	34	0,61	nein

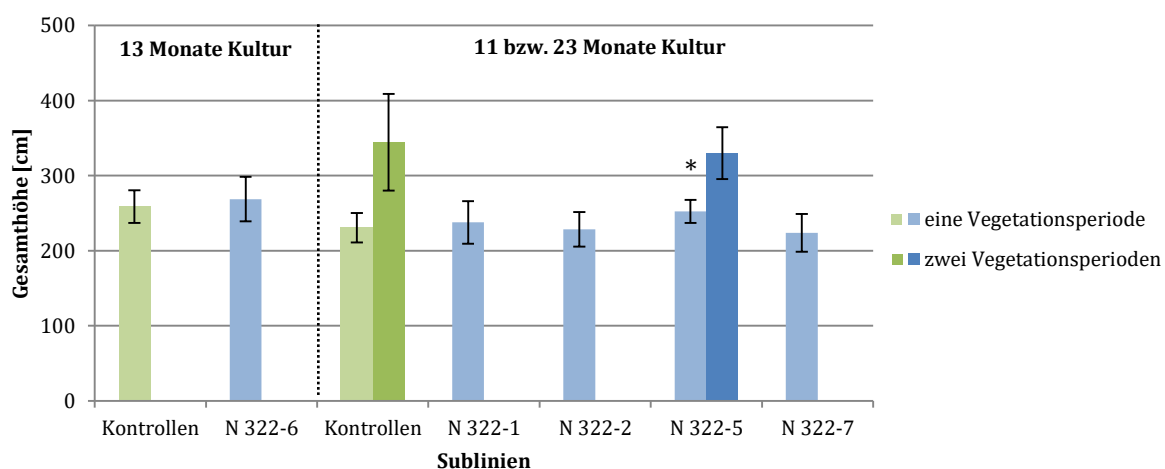


Abb. 3.71: Mittelwertvergleich der Gesamthöhenmessungen von N 322

Eine signifikante Mittelwertabweichung ($p \leq 0,05$) der Linie N 322-5 wurde nach einer Vegetationsperiode ermittelt ($p = 0,04$, markiert mit *), allerdings nicht nach der zweiten Vegetationsperiode ($p = 0,61$). Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an.

Nach zwölf bzw. zehn Monaten Kultivierung wurde die Gesamthöhe der Pappeln von N 327 gemessen. Signifikant abweichende Sublinien wurden nicht ermittelt (Abb. 3.72).

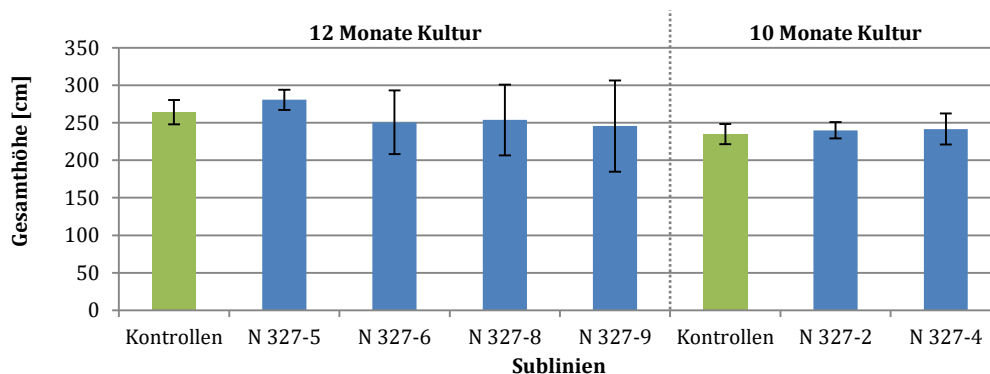


Abb. 3.72: Mittelwertvergleich der Gesamthöhenmessungen von N 327

Die Messdaten wurden nach zwölf bzw. zehn Monaten Kultivierung erhoben. Die Überführung der Pappeln von N 327 wurde im Winterhalbjahr vorgenommen, sodass die Vegetationsperiode künstlich verlängert wurde. Signifikant abweichende Linien ($p \leq 0,05$) wurden nicht beobachtet. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an.

Holzchemische Analysen

Neun ausgewählte Individuen von N 322, die über 13 Monate im Gewächshaus angezogen wurden, wurden zur biochemischen Untersuchung der Biomasse an das Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung (Potsdam, K. Hettrich) übergeben: 17878, 17879 und 17881 (N 322-5), 17887, 17889 und 17885 (N 322-7) sowie 17775, 17776 und 17777 (nicht-transgene Kontrollpflanzen). Die Holzuntersuchung ergab, dass die Pappeln der transgenen Linie N 322-7 mit durchschnittlich 2,2% signifikant mehr Cellulose als die nicht-transgenen Kontrollpflanzen enthielten ($p = 0,03$, Tab. 3.45). Alle anderen Holzbestandteile waren in den transgenen Pflanzen unverändert.

Tab. 3.45: Prozentuale chemische Zusammensetzung des Sprossgewebes der Linien N 322-5 und N 322-7

Die Mittelwerte M der einzelnen Bestandteile wurden aus drei Individuen berechnet. Sie entsprachen etwa den Mittelwerten der nicht-transgenen Kontrollpflanzen. Eine signifikante Abweichung ($p \leq 0,05$) lag lediglich beim Cellulosegehalt von N 322-7 vor (mit * markiert). Der Wert lag 2,2% höher als bei den nicht-transgenen Kontrollen ($p = 0,03$). Die Analysen wurden am Fraunhofer IAP durchgeführt (K. Hettrich). Abkürzungen: M - Mittelwert, s - Standardabweichung, p - Irrtumswahrscheinlichkeit für signifikante Abweichung.

Bestandteile	Transgene Pflanzen der Linie N 322						Nicht-transgene Kontrollen	
	N 322-5			N 322-7			M	s
	M	s	p	M	s	p	M	s
Asche	2,8	0,2	0,62	2,5	0,3	0,46	2,7	0,1
Protein	2,8	0,3	0,40	2,6	0,3	0,63	2,4	0,5
Ethanol-Extraktstoffe	19,2	0,6	0,43	18,2	0,6	0,19	20,3	1,5
Cellulose	33,4	0,2	0,16	34,5	0,4	0,03 *	32,3	0,7
Hemicellulose	21,1	0,2	0,16	21,0	0,3	0,31	20,7	0,3
Lignin	17,3	0,3	0,34	17,6	0,3	0,14	16,9	0,4

Für eine zweite Untersuchung wurden drei ausgewählte Individuen der Linie N 327-4 (17918, 17919, 17920), die über 13 Monate im Gewächshaus angezogen wurden, zur biochemischen Untersuchung der Biomasse an das Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung (Potsdam, K. Hettrich) übergeben. Die Holzuntersuchung ergab keine signifikanten Abweichungen in der Holzzusammensetzung (Tab. 3.46).

Tab. 3.46: Prozentuale chemische Zusammensetzung des Sprossgewebes von drei Individuen der Linie N 327-4

Die Mittelwerte der einzelnen Bestandteile entsprechen etwa den Mittelwerten der nicht-transgenen Kontrollpflanzen. Eine signifikante Abweichung ($p \leq 0,05$) lag nicht vor. Die Analysen wurden am Fraunhofer IAP durchgeführt (K. Hettrich). Abkürzungen: M - Mittelwert, s - Standardabweichung, p - Irrtumswahrscheinlichkeit für signifikante Abweichung.

Bestandteile	N 327-4			Nicht-transgene Kontrollen	
	M	s	p	M	s
Asche	2,5	0,1	0,29	2,7	0,1
Protein	2,2	0,2	0,62	2,4	0,5
Ethanol-Extraktstoffe	16,8	0,8	0,07	20,3	1,5
Cellulose	33,9	0,1	0,09	32,3	0,7
Hemicellulose	21,3	0,2	0,09	20,7	0,3
Lignin	17,9	0,6	0,16	16,9	0,4

3.2.3.2 Herunterregulation

Zur Herunterregulation von Potri.019G084600 wurden zwei unterschiedliche Transformations-vektoren eingesetzt: Die beiden Vektoren A220 und A231 kodierten für eine amiRNA zum *Knockdown* des Zielgens sowie die Kanamycinresistenz *NPTII* zur Selektion. Für A220 wurde der *Agrobacterium*-Stamm EHA105 und für A231 GV3101-pMP90RK verwendet, während das eigentliche Ti-Plasmid identisch war. Am 22.05.2013 wurde die Transformation N 359 mit A220 und am 24.07.2013 die Transformation N 374 mit A231 durchgeführt. Empfängerorganismus war beide Male der *P. × canescens*-Klon P1.

Molekulargenetische Untersuchungen

Beide transgene Linien wurden molekulargenetisch auf den Transformationserfolg untersucht, indem per PCR und anschließender Gelelektrophorese die Anwesenheit des Selektionsmarkers *NPTII* (Abb. 3.73) und des Zielgens (Abb. 3.74) überprüft wurde, wie im Folgenden exemplarisch für die Transformation N 374 dargestellt. Von insgesamt 19 putativ transgenen Regeneraten aus beiden Transformationen wurde der transgene Status bei 12 Linien verifiziert.

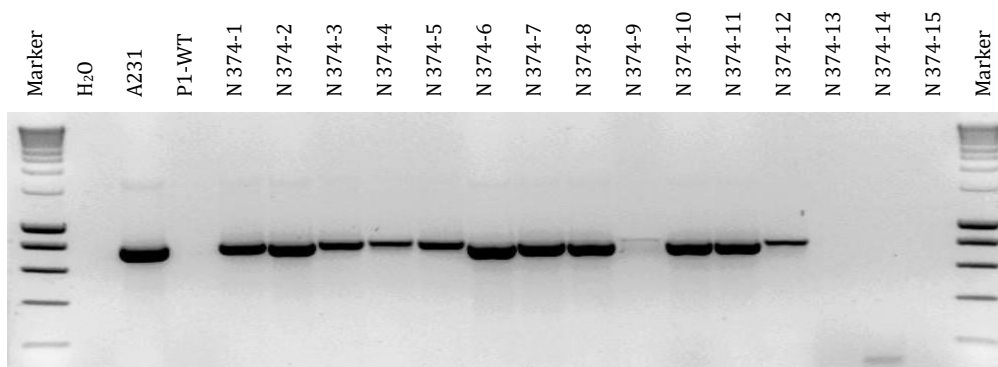


Abb. 3.73: Gelelektrophoretischer Nachweis des Selektionsmarkers *NPTII*

Die PCR wurde mit den Primern #317 und #318 bei einer *Annealing*-Temperatur von 57 °C und mit 40 Amplifikationszyklen durchgeführt. 5 µL der PCR-Produkte wurden auf einem 1,3% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. Die Linien N 374-1 bis -12 wurden positiv auf das Resistenzgen getestet, wobei in Linie N 374-9 nur ein schwaches Amplikon nachweisbar war. Die Linien N 374-13, -14 und -15 waren negativ.

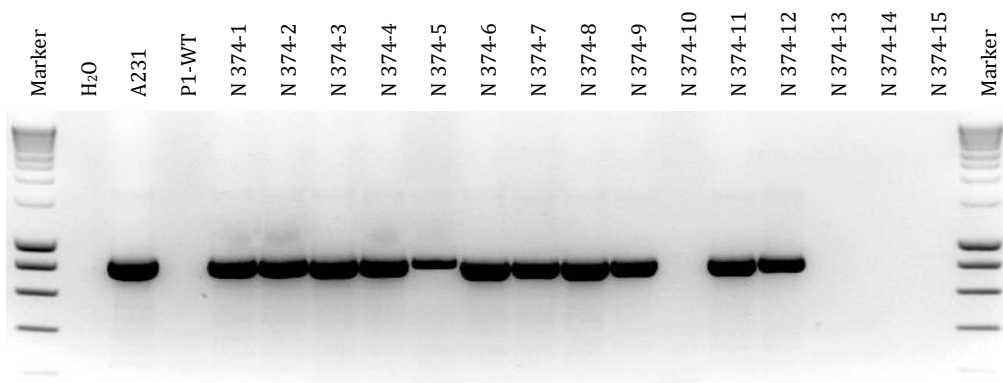


Abb. 3.74: Gelelektrophoretischer Nachweis des Zielgens

Die PCR wurde mit den Primern #1416 und #1417 bei einer *Annealing*-Temperatur von 57 °C und mit 40 Amplifikationszyklen durchgeführt. 5 µL der PCR-Produkte wurden auf einem 1,3% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. In den Linien N 374-1 bis -9 sowie N 374-11 und -12 wurde die Zielsequenz nachgewiesen.

Zur Quantifizierung der Kopienanzahl, mit der die T-DNA der Transformationsvektoren in den Sublinien vorlag, wurden Southern Blots mit der Sonde für den Selektionsmarker *NPTII* durchgeführt. Nachstehend ist das exemplarische Southern Blot für N 374 abgebildet (Abb. 3.75). Insgesamt wurden sechs Linien mit einer Kopie und fünf Linien mit zwei Kopien ermittelt. Eine Linie enthielt zwei bis drei Kopien der T-DNA (Tab. 3.47).

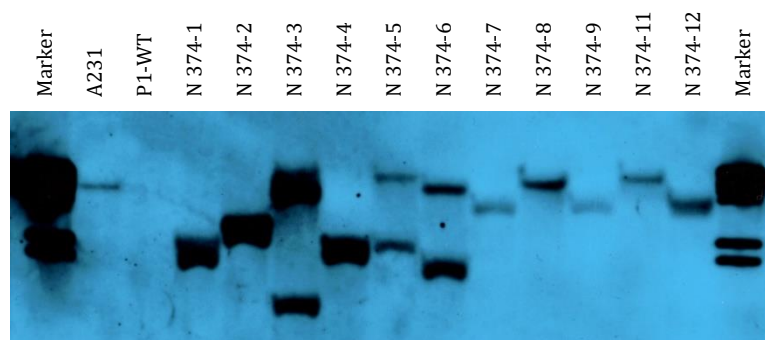


Abb. 3.75: Southern Blot zur Quantifizierung der Kopienanzahl in N 374

Die DNA für dieses Southern Blot wurde mit *EcoRI* restringiert. Die Digoxigenin-markierte Sonde bindet im Markergen *NPTII* und wurde mit den Primern #317 und #318 synthetisiert. Die Sonde ist 780 bp lang. Als Fragmentlängenmarker wurde der DIG-Marker II (Fa. Roche, Mannheim) verwendet.

Tab. 3.47: Ermittelte Kopienzahlen in unabhängigen transgenen Linien von N 374 und N 359

Per Southern Blot-Analyse wurden die Kopienzahlen der T-DNA von A220 bzw. A231 im Pappelgenom quantifiziert. Die Kopienzahl in N 374-3 war nicht eindeutig zu bestimmen und wurde auf zwei bis drei festgelegt

Kopienzahlen der T-DNA	Transgene Linien
1	N 359-3
	N 374-7, -8, -9, -11, -12
2	N 374-1, -2, -4, -5, -6
2-3	N 374-3

Phänotypisierung

Von N 374 wurden zahlreiche Pappeln ins Gewächshaus überführt und hier kultiviert, um die Pflanzen von ausgewählten Sublinien zusammen mit nicht-transgenen Kontrollpflanzen unter naturnahen Bedingungen außerhalb der Gewebekultur zu analysieren. Signifikant kleiner waren die Pflanzen der Linie N 374-7 nach zwei Vegetationsperioden, während sie nach der ersten Vegetationsperiode das Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ noch nicht erreicht hatten. Alle übrigen Sublinien wichen nicht signifikant von den nicht-transgenen Kontrollpflanzen ab (Tab. 3.48, Abb. 3.76).

Tab. 3.48: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linie N 374 im Gewächshaus

Die Gesamthöhen der Pappeln wurden nach Abschluss der ersten und der zweiten Vegetationsperiode erhoben. Eine signifikante Mittelwertabweichung wurde bei $p \leq 0,05$ angenommen. Die Pappeln der Linie N 374-7 waren nach zwei Vegetationsperioden signifikant kleiner ($p = 0,02$).

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standardabweichung [cm]	p	Signifikanz
6 Monate Kultur, eine Vegetationsperiode						
Kontrollen	10	92	89	16		
N 374-3	10	96	98	15	0,53	nein
N 374-5	9	102	109	20	0,26	nein
N 374-7	7	73	78	30	0,20	nein
N 374-8	15	81	83	19	0,16	nein
N 374-9	10	104	109	15	0,10	nein
N 374-11	8	109	126	28	0,17	nein
N 374-12	10	102	100	20	0,24	nein
18 Monate Kultur, zwei Vegetationsperioden						
Kontrollen	8	271	278	18		
N 374-3	8	259	268	23	0,82	nein
N 374-5	8	259	268	23	0,82	nein
N 374-7	7	196	191	46	0,02	ja, signifikant kleiner
N 374-8	8	217	230	52	0,09	nein
N 374-9	8	263	266	13	0,43	nein
N 374-11	8	255	276	54	0,92	nein
N 374-12	8	255	261	30	0,90	nein

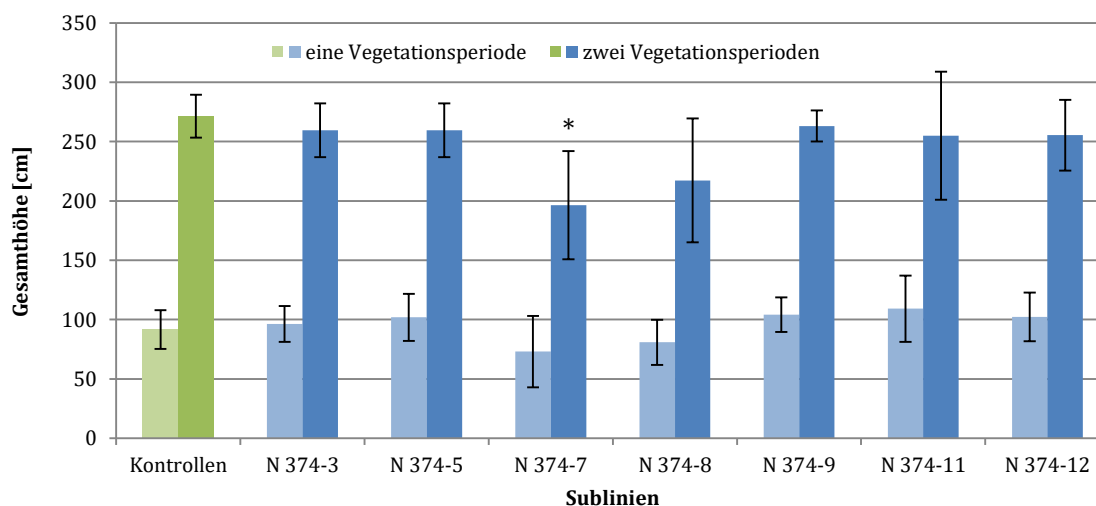


Abb. 3.76: Mittelwertvergleich der Gesamthöhenmessungen von N 374

Die Messdaten wurden nach einer bzw. nach zwei Vegetationsperioden erhoben. Eine signifikante Mittelwertabweichung ($p \leq 0,05$) wurde nach der zweiten Vegetationsperiode in der Sublinie N 374-7 festgestellt ($p = 0,02$, markiert mit *). Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an.

3.2.4 Überexpression von Potri.005G123800

Bei dem durch Potri.005G123800 (ehemals POPTR_0005s12520), auch als *GRAS16* bezeichnet, kodierten Protein handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor mit GRAS-Domäne (<https://phytozome.jgi.doe.gov>, Zugriff am 30.01.2016). Sie bezeichnet zwei Leucin-reiche Bereiche, die ein Motiv aus fünf bestimmten Aminosäuren (Valin-Histidin-Isoleucin-Isoleucin-Asparaginsäure, entspricht dem Kurzcode VHIID) umschließen (Bolle 2004). Ein Sequenzabgleich mit *Arabidopsis thaliana* offenbarte Ähnlichkeiten zum *Scarecrow-like transcription factor 7 (SCL7)*. Den GRAS-Transkriptionsfaktoren, zu deren Genfamilie auch *Scarecrow (SCR)* und *Scarecrow-like transcription factors (SCL)* gehören, kommen ausschließlich in Pflanzen vor. Ihnen wird eine Rolle in der Wurzel- und Sprossentwicklung sowie der Blühinduktion zugeschrieben (Pysh *et al.* 1999, Bolle 2004). Das Gen war auf dem Minus-Strang von Chromosom 5 im Bereich 9.639.841-9.642.923 lokalisiert. Drei mögliche Transkripte waren annotiert (Abb. 3.77). Die Daten aus dem eFP-Browser zeigten eine starke Expression des Gens im sich entwickelnden Xylem und den Wurzeln (Abb. 3.78, <http://bar.utoronto.ca/efppop/cgi-bin/efpWeb.cgi>, Zugriff am 10.02.2016).

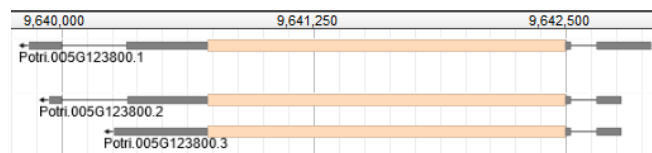


Abb. 3.77: Transkript-Modelle von Potri.005G123800

Die drei Transkriptmodelle unterschieden sich nicht in der kodierenden Region, allerdings in den untranslatierten Regionen (Quelle: Phytozome 11, <https://phytozome.jgi.doe.gov>, Zugriff am 30.01.2016).

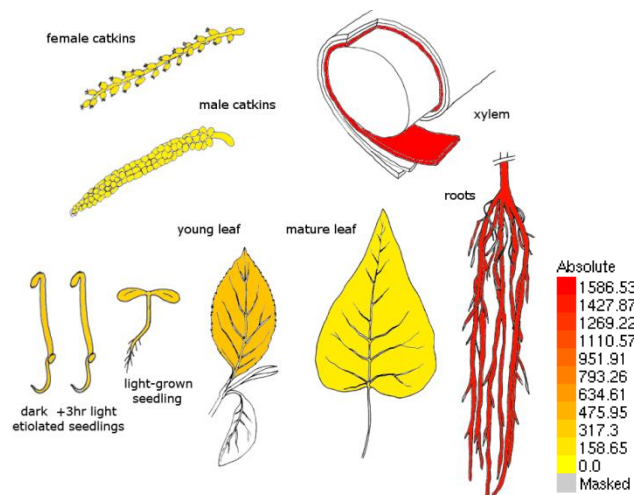


Abb. 3.78: Expressionsdaten aller drei Transkripte von Potri.005G123800 in verschiedenen Pappelgeweben

Für alle drei Transkripte wurden die gleichen Expressionsdaten ausgegeben (<http://bar.utoronto.ca/efppop/cgi-bin/efpWeb.cgi>, Zugriff am 10.02.2016). Sie werden vor allem im sich entwickelnden Xylem und den Wurzeln exprimiert.

Nachfolgend sind die Ergebnisse der Überexpression des Gens Potri.005G123800, das als GRAS-Transkriptionsfaktor charakterisiert wurde, aufgeführt. Die genetischen Veränderungen führten nur in einem Fall zu signifikanten Änderungen der Pflanzenhöhe. Die überprüften Individuen enthielten allerdings signifikant mehr Cellulose als die nicht-transgenen Kontrollpflanzen.

Zwei Transformationen wurden zur Überexpression des Zielgens durchgeführt: am 16.11.2012 die Transformation N 329 und am 15.01.2013 die Transformation N 340. Für beide Transformationen wurde der Vektor A204 eingesetzt, der neben dem Zielgen die Hygromycinresistenz *HPT* zur Selektion beinhaltet. Empfängerorganismus war für beide Transformationen der *P. × canescens*-Klon P1.

Molekulargenetische Untersuchungen

Die molekulargenetischen Untersuchungen zum Nachweis des Transformationserfolgs sind im Folgenden exemplarisch für N 340 dargestellt: Per PCR und anschließender Gelelektrophorese wurden der Selektionsmarker *HPT* (Abb. 3.79) und das Zielgen (Abb. 3.80) nachgewiesen. Von den zwei Transformationen wurden insgesamt elf putativ transgene Regenerate erhalten, von denen sich neun als transgen herausstellten.

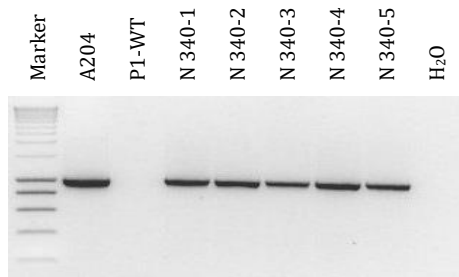


Abb. 3.79: Gelelektrophoretischer Nachweis des Selektionsmarkers *HPT*

Die PCR wurde mit den Primern #337 und #338 bei einer *Annealing*-Temperatur von 58 °C und mit 40 Amplifikationszyklen durchgeführt. 5 µL der PCR-Produkte wurden auf einem 1,3% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. Alle fünf überprüften Sublinien enthielten das Resistenzgen.

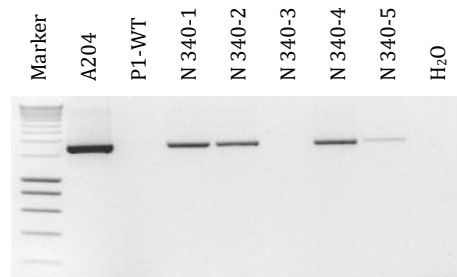


Abb. 3.80: Gelelektrophoretischer Nachweis des Zielgens

Die PCR wurde mit den Primern #1193 und #1361 bei einer *Annealing*-Temperatur von 52 °C und mit 40 Amplifikationszyklen durchgeführt. 5 µL der PCR-Produkte wurden auf einem 1,3% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. In vier der Linien, N 340-1, -2, -4 und -5, wurde die Zielgensequenz nachgewiesen.

Zur Quantifizierung der Kopienanzahl, mit der die T-DNA von Transformationsvektor A204 in den Sublinien vorlag, wurden Southern Blots durchgeführt, wie exemplarisch für N 340 gezeigt wird (Abb. 3.81). Es wurden sechs Sublinien mit einer Kopie, drei Sublinien mit zwei Kopien und eine Sublinie mit drei Kopien identifiziert (Tab. 3.49).

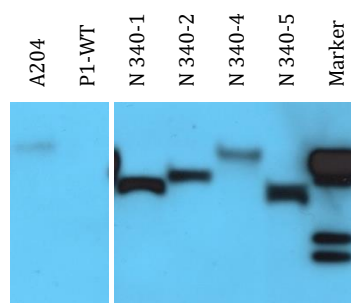


Abb. 3.81: Southern Blot zur Quantifizierung der Kopienanzahl in N 340

Die DNA für dieses Southern Blot wurde mit *SacI* restringiert. Die Digoxigenin-markierte Sonde bindet im Markergen *HPT* und wurde mit den Primern #337 und #338 synthetisiert. Die Sonde ist 980 bp lang. Als Fragmentlängenmarker wurde der DIG-Marker II (Fa. Roche, Mannheim) verwendet.

Tab. 3.49: Ermittelte Kopienzahlen in unabhängigen transgenen Linien von N 340 und N 329

Per Southern Blot-Analyse wurden die Kopienzahlen der T-DNA von A204 im Pappelgenom quantifiziert.

Kopienzahlen der T-DNA	Transgene Linien
1	N 340-1, -2, -3, -4
	N 329-3, -6
2	N 340-5
	N 329-2, -4
3	N 329-1

Zur Ermittlung der T-DNA-Integrationsorte und zur Prüfung von möglichen Positionseffekten wurden für N 340-2 und -3 TAIL-PCRs mit 128-fach bzw. 256-fach degenerierten Primern sowie den spezifischen Primern #544 für TAIL-PCR I, #545 für TAIL-PCR II und #546 für TAIL-PCR III durchgeführt. Die Primer amplifizierten die DNA über die *Right Border* hinaus. Die genomischen Bereiche außerhalb der T-DNA wurden mit einer *BLAST*-Analyse in *P. trichocarpa* und *P. × canescens* (<https://phytozome.jgi.doe.gov>, <http://aspen.db.uga.edu/spta717/Blast>, Zugriff am 22.02.2016) detektiert. Die identifizierten Bereiche sind in Tab. 3.50 zusammengefasst: In N 340-2 wurde die T-DNA in Chromosom 10 integriert, in N 340-3 in Chromosom 1. Betroffen waren in beiden Fällen Sequenzbereiche ohne funktionelle Annotierung. Ein Positionseffekt war daher unwahrscheinlich.

Tab. 3.50: Integrationsorte der transgenen Linie N 340

Die Integrationsorte wurden durch eine *BLAST*-Analyse in den Datenbanksequenzen von *P. trichocarpa* (*Pt*, Version 3.0) und *P. × canescens* (*Pc*, Version 1.1) ermittelt. Die Angaben zu den funktionellen Annotierungen der Loci basieren auf *P. trichocarpa*. Farblich hinterlegt sind die Linien mit signifikant abweichender Gesamthöhe.

Sublinie	Integrationsort	Art	Score <i>Pt</i> (<i>Pc</i>)	E-Wert <i>Pt</i> (<i>Pc</i>)	Funktionelle Annotierung des Integrationslocus
N 340-2	Chromosom 10	<i>Pt</i> , <i>Pc</i>	407,0 (449)	8,2E-112 (1E-124)	Ohne funktionelle Annotierung
N 340-3	Chromosom 1	<i>Pt</i> , <i>Pc</i>	158,2 (169)	8,2E-38 (4E-41)	Ohne funktionelle Annotierung

Phänotypisierung

Von den beiden Überexpressionslinien N 340 und N 329 wurden zahlreiche Pflanzen von ausgewählten Sublinien zusammen mit nicht-transgenen Kontrollpflanzen ins Gewächshaus überführt und hier kultiviert, um sie unter naturnahen Bedingungen außerhalb der Gewebekultur zu analysieren.

Die Pappeln der Linie N 340 wurden nach acht und 19 Monaten bezüglich ihrer Gesamthöhe vermessen. In beiden Erhebungen wurden die Pflanzen der Linie N 340-2 im Vergleich zu den nicht-transgenen Kontrollpflanzen als signifikant kleiner ermittelt ($p = 0,00$). Die anderen Sublinien erreichten das Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ nicht (Tab. 3.51, Abb. 3.82).

Tab. 3.51: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linie N 340 im Gewächshaus

Die Gesamthöhen der Pappeln wurden nach acht- bzw. 19-monatiger Kultivierung erhoben. In beiden Höhenmessungen wurden die Pflanzen der Linie N 340-2 als signifikant kleiner ermittelt ($p = 0,00$). Die übrigen Sublinien von N 340 zeigten keine signifikanten Veränderungen.

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standardabweichung [cm]	p	Signifikanz
8 Monate Kultur, eine Vegetationsperiode						
Kontrollen	10	144	140	14		
N 340-1	6	155	154	17	0,28	nein
N 340-2	8	101	99	18	0,00	ja, signifikant kleiner
N 340-3	8	156	157	14	0,12	nein
N 340-4	8	119	125	33	0,10	nein
N 340-5	8	133	129	12	0,10	nein
19 Monate Kultur, zwei Vegetationsperioden						
Kontrollen	10	303	327	41		
N 340-1	4	327	324	21	0,31	nein
N 340-2	4	237	236	14	0,00	ja, signifikant kleiner
N 340-3	5	329	333	14	0,13	nein
N 340-4	7	260	278	59	0,15	nein
N 340-5	8	300	303	27	0,85	nein

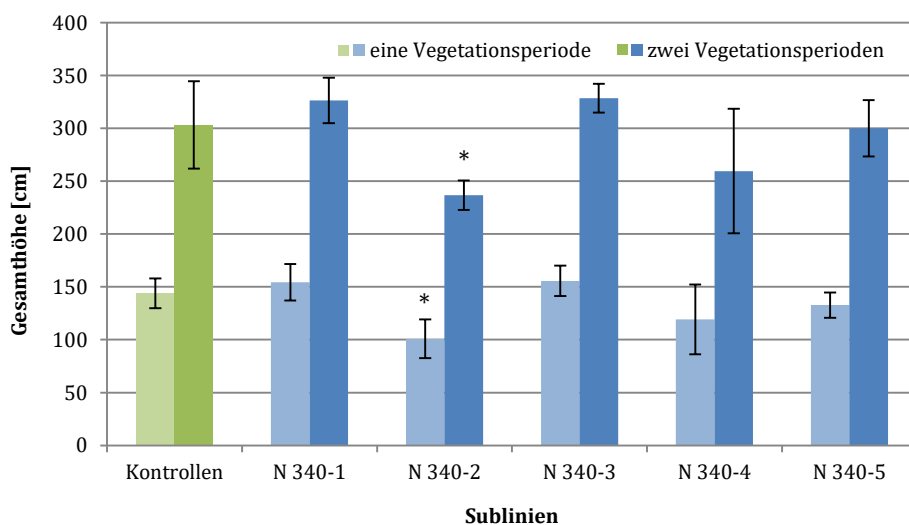


Abb. 3.82: Mittelwertvergleich der Gesamthöhenmessungen von N 340

Die Messdaten wurden nach einer und nach zwei Vegetationsperioden erhoben. Die signifikant abweichende Linie ($p \leq 0,05$) N 340-2 ist mit * markiert ($p = 0,00$). Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an.

Die Pappeln der Sublinie N 340-2 waren signifikant kleiner als die nicht-transgenen Kontrollpflanzen (Abb. 3.83). Die mediane transgene Pflanze war nach 19 Monaten Kultur am Ende der zweiten Vegetationsperiode 91 cm kleiner als die mediane Kontrollpflanze. Sogar die größte Pflanze der Linie N 340-2 erreichte mit 257 cm Gesamthöhe nicht die 327 cm hohe mediane Kontrollpflanze.



Abb. 3.83: Signifikant abweichender Phänotyp der Linie N 340-2

Abgebildet sind die kleinste, die mediane und die größte Pappel der Linie N 340-2, zudem die mediane, nicht-transgene Kontrollpflanze (von links nach rechts). Die transgenen Pflanzen waren signifikant kleiner als die Kontrollpflanzen ($p = 0,00$). Aufgrund der großen Höhe der Pappeln konnte im oberen Bereich kein schwarzer Hintergrund installiert werden.

Nach einer Vegetationsperiode wurde die Gesamthöhe der Pappeln von N 329 gemessen. Lediglich die Sublinie N 329-6 war signifikant kleiner als die nicht-transgenen Kontrollen ($p = 0,04$). Nach einer weiteren Vegetationsperiode konnte die Signifikanz dieser Sublinie nicht bestätigt werden ($p = 0,38$, Tab. 3.52). Die nach der ersten Vegetationsperiode nicht signifikanten Linien wurden nicht weiter kultiviert.

Tab. 3.52: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linie N 329 im Gewächshaus

Eine signifikante Mittelwertabweichung wurde nach einer Vegetationsperiode nur von der Sublinie N 329-6 erreicht. Diese Pflanzen waren signifikant kleiner ($p = 0,04$) und wurden deswegen zur Verifizierung für eine weitere Vegetationsperiode weiterkultiviert. Nach der zweiten Vegetationsperiode konnte die Signifikanz nicht bestätigt werden ($p = 0,38$).

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standardabweichung [cm]	p	Signifikanz
11 Monate Kultur, eine Vegetationsperiode						
Kontrollen	7	235	239	27		
N 329-1	9	218	227	39	0,37	nein
N 329-2	10	220	221	26	0,31	nein
N 329-3	4	221	219	10	0,28	nein
N 329-4	10	241	239	12	0,61	nein
N 329-6	10	199	202	33	0,04	ja, signifikant kleiner
23 Monate Kultur, zwei Vegetationsperioden						
Kontrollen	7	342	364	55		
N 329-6	5	303	305	71	0,38	nein

Holzchemische Analysen

Sechs ausgewählte Pappeln von N 329, die über zwölf Monate im Gewächshaus angezogen wurden, wurden zur biochemischen Untersuchung der Biomasse an das Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung (Potsdam, K. Hettrich) übergeben: 17959, 17962 und 17960 (N 329-4), 17974, 17969 und 17967 (N 329-6) sowie 17775, 17776 und 17777 (nicht-transgene Kontrollpflanzen). Die Holzuntersuchung ergab, dass die Pappeln der transgenen Linie N 329-4 und N 329-6 durchschnittlich jeweils 3,2% bzw. 2,2% mehr Cellulose als die nicht-transgenen Kontrollpflanzen enthielten ($p = 0,03$). In N 329-6 wurde zudem ein signifikant kleinerer Anteil an Ethanol-Extraktstoffen ermittelt ($p = 0,04$). Alle anderen Bestandteile zeigten keine signifikanten Abweichungen auf ($p > 0,05$, Tab. 3.53).

Tab. 3.53: Prozentuale chemische Zusammensetzung des Sprossgewebes der Linien N 329-4 und N 329-6

Die Mittelwerte M der einzelnen Bestandteile wurden aus drei Individuen berechnet. Sie entsprachen etwa den Mittelwerten der nicht-transgenen Kontrollpflanzen. Signifikante Abweichungen ($p \leq 0,05$) lagen beim Cellulosegehalt beider transgener Linien vor (mit * markiert). Der Wert lag mit 35,5% bzw. 34,5% um 3,2% bzw. 2,2% höher als bei den nicht-transgenen Kontrollen. In N 329-6 wurde zudem ein signifikant kleinerer Anteil an Ethanol-Extraktstoffen ermittelt. Die Analysen wurden am Fraunhofer IAP durchgeführt (K. Hettrich). Abkürzungen: M - Mittelwert, s - Standardabweichung, p - Irrtumswahrscheinlichkeit für signifikante Abweichung.

Bestandteile	Transgene Pflanzen der Linie N 329						Nicht-transgene Kontrollen	
	N 329-4			N 329-6			M	s
	M	s	p	M	s	p	M	s
Asche	2,6	0,1	0,66	2,8	0,2	0,71	2,7	0,1
Protein	3,1	0,3	0,16	4,4	1,3	0,15	2,4	0,5
Ethanol-Extraktstoffe	16,6	1,2	0,06	15,8	0,5	0,04 *	20,3	1,5
Cellulose	35,5	1,0	0,03 *	34,5	0,6	0,03 *	32,3	0,7
Hemicellulose	20,4	0,2	0,33	20,8	0,3	0,70	20,7	0,3
Lignin	16,7	0,1	0,45	17,0	0,3	0,92	16,9	0,4

3.2.5 Genetische Modifikation von Potri.002G223100

Für das Gen Potri.002G223100 (ehemals POPTR_0002s22040) waren keine funktionellen Annotationen im Genom von *P. trichocarpa* hinterlegt (Phytozome 11, <https://phytozome.jgi.doe.gov>, Zugriff am 30.01.2016). Es war auf dem Minus-Strang von Chromosom 2 im Bereich 21.016.834-21.018.237 kodiert. Basierend auf den Daten des eFP-Browsers wird das Transkript Potri.002G223100.1 stark im Xylem exprimiert (Abb. 3.84, <http://bar.utoronto.ca/efppop/cgi-bin/efpWeb.cgi>, Zugriff am 10.02.2016).

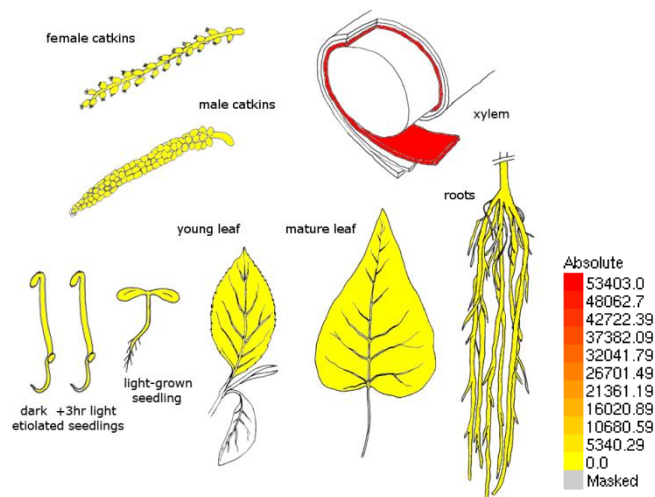


Abb. 3.84: Expressionsdaten des Transkripts Potri.002G223100.1 in verschiedenen Pappelgeweben

Die stärkste Expression wurde im Xylem festgestellt. In allen anderen Geweben wird das Gen nur schwach exprimiert (Quelle: <http://bar.utoronto.ca/efppop/cgi-bin/efpWeb.cgi>, Zugriff am 10.02.2016).

Zur genetischen Modifikation des Kandidatengens Potri.002G223100 wurden insgesamt vier Transformationsansätze, davon jeweils zwei Überexpressions- und *Knockdown*-Ansätze, durchgeführt.

Die Überexpression von Potri.002G223100 führte nur in geringem Umfang zu verwertbaren Daten. Lediglich eine transgene Linie wurde herangezogen, die den Selektionsmarker enthielt. Keine der herangezogenen Linien enthielt das Zielgen. Eine weitere, nicht näher beschriebene Transformation (N 321 vom 30.10.2012) wurde ebenfalls mit dem Überexpressionsvektor A200 durchgeführt. Wie auch in N 391 enthielt auch hier keine der herangezogenen Linien das Zielgen. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass eine Überexpression von Potri.002G223100 zu nicht-überlebensfähigen Pflanzen führt.

Die Herunterregulation von Potri.002G223100 führte in mehreren Fällen zu Pflanzen mit signifikant abweichender Wuchshöhe. Die Biomassezusammensetzung war in den untersuchten Proben zu einem erhöhten Proteinanteil verändert. Die drei Hauptbestandteile des Holzes waren unverändert.

3.2.5.1 Überexpression

Zwei Transformationen wurden zur Überexpression von Potri.002G223100 mit dem Vektor A200 durchgeführt. Neben dem Zielgen kodierte der Vektor für die Kanamycinresistenz *NPTII* zur Selektion. Empfängerorganismus für beide Transformationen war der *P. × canescens*-Klon P1.

Die erste Transformation N 321 mit A200 wurde am 30.10.2012 durchgeführt. Fünf putativ transgene Sublinien wurden aus der Transformation herangezogen, deren transgener Status in den nachfolgenden Analysen aber nicht nachgewiesen werden konnte. Im Januar 2015 starben alle Sublinien von N 321 ab.

Eine weitere Überexpressionslinie war N 391, deren Transformation am 31.10.2013 durchgeführt wurde und die im Folgenden im Detail beschrieben wird.

Molekulargenetische Untersuchungen

Aus der Transformation wurden sieben putativ transgene Sublinien herangezogen. Vor Beginn der Untersuchungen reduzierte sich die Anzahl auf sechs Linien, N 391-3 starb in der Gewebekultur ab. Per PCR und anschließender Gelelektrophorese wurde die Anwesenheit des Selektionsmarkers *NPTII* (Abb. 3.85) und des Zielgens (Abb. 3.86) überprüft. Das Resistenzgen konnte lediglich in der Sublinie N 391-1 nachgewiesen werden, allerdings wurde in keiner Sublinie die Zielgensequenz amplifiziert.

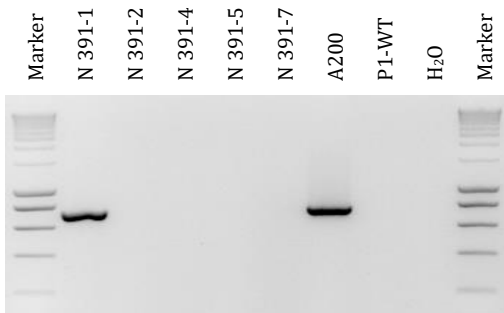


Abb. 3.85: Gelelektrophoretischer Nachweis des Selektionsmarkers *NPTII*

Die PCR wurde mit dem Primerpaar #343 und #344 bei einer *Annealing*-Temperatur von 62 °C und mit 40 Amplifikationszyklen durchgeführt. 5 µL der PCR-Produkte wurden auf einem 1,5% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. Das Resistenzgen konnte nur in N 391-1 nachgewiesen werden. Die Sublinie N 391-6 enthielt das Resistenzgen ebenfalls nicht (ohne Abbildung).

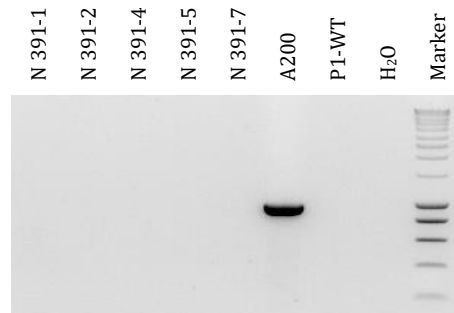


Abb. 3.86: Gelelektrophoretischer Nachweis des Zielgens

Die PCR wurde mit dem Primerpaar #1360 und #1361 bei einer *Annealing*-Temperatur von 52 °C und mit 38 Amplifikationszyklen durchgeführt. 5 µL der PCR-Produkte wurden auf einem 1,0% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. In allen getesteten Sublinien von N 391 wurde das Zielgen nicht nachgewiesen. Die Sublinie N 391-6 enthielt das Zielgen ebenfalls nicht (ohne Abbildung).

Per Southern Blot wurde das PCR-Ergebnis verifiziert und die Kopienanzahl in N 391 quantifiziert. In N 391-1 konnte eine Kopie der Kanamycinresistenz *NPTII* nachgewiesen werden (Abb. 3.87). Alle übrigen untersuchten Sublinien waren, in Übereinstimmung mit den PCR-Ergebnissen, nicht transgen. Die Pappeln dieser Linie wurden daher in dieser Studie nicht weiter berücksichtigt.



Abb. 3.87: Southern Blot zur Quantifizierung der Kopienanzahl in N 391

Die DNA für dieses Southern Blot wurde mit *EcoRI* restringiert. Die Digoxigenin-markierte Sonde bindet im Markergen *NPTII* und wurde mit den Primern #317 und #318 synthetisiert. Die Sonde ist 780 bp lang. Als Fragmentlängenmarker wurde der DIG-Marker II (Fa. Roche, Mannheim) verwendet. Eine Kopie der T-DNA wurde in N 391-1 nachgewiesen. In den übrigen Sublinien war die T-DNA nicht nachweisbar.

3.2.5.2 Herunterregulation

Zur Herunterregulation von Potri.002G223100 wurden zwei Transformationsvektoren verwendet: A221 (N 361) und A232 (N 375). Das eigentliche Vektorkonstrukt ist in A221 und A232 identisch, allerdings lagen die Vektoren in zwei unterschiedlichen *Agrobacterium*-Stämmen vor. Bei A221 handelte es sich um Agrobakterien des Stamms EHA105, bei A232 um GV3101-pMP90RK. Da die Transformationsrate der Transformationen mit EHA105-Agrobakterien gering war, wurde eine zweite Transformation mit dem effektiveren Stamm GV3101-pMP90RK durchgeführt. Die Vektoren kodierten für eine amiRNA zum *Knockdown* von Potri.002G223100 und die Kanamycinresistenz *NPTII* zur Selektion. Alle Transformationen wurden mit dem *P. × canescens*-Klon P1 durchgeführt.

Molekulargenetische Untersuchungen

Der Transformationserfolg wurde auf molekulargenetischer Ebene untersucht indem der Selektionsmarker *NPTII* (Abb. 3.88) und das Zielgen (Abb. 3.89) nachgewiesen wurden, wie im Folgenden exemplarisch für N 361 gezeigt. Von insgesamt 20 putativ transgenen Regeneraten aus beiden durchgeführten Transformationen enthielten 18 Sublinien das Kanamycin-Resistenzgen und 16 Sublinien das Zielgen.

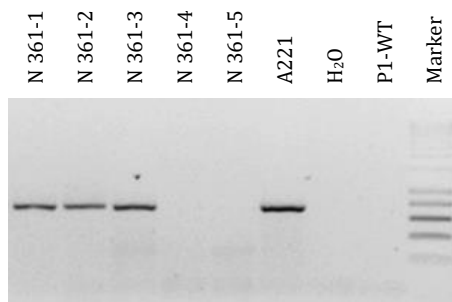


Abb. 3.88: Gelelektrophoretischer Nachweis des Selektionsmarkers *NPTII*

Die PCR wurde mit den Primern #343 und #344 bei einer *Annealing*-Temperatur von 60 °C und mit 40 Amplifikationszyklen durchgeführt. 5 µL der PCR-Produkte wurden auf einem 1,3% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. Das Resistenzgen wurde in den drei Sublinien N 361-1, -2 sowie -3 nachgewiesen. Die Sublinien N 361-4 und -5 enthielten den Selektionsmarker nicht.

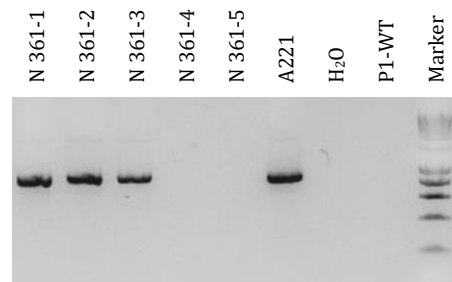


Abb. 3.89: Gelelektrophoretischer Nachweis des Zielgens

Die PCR wurde mit den Primern #1416 und #1417 bei einer *Annealing*-Temperatur von 58 °C und mit 35 Amplifikationszyklen durchgeführt. 5 µL der PCR-Produkte wurden auf einem 1,5% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. Die Zielgen-Sequenz wurde in den drei Sublinien N 361-1, -2 sowie -3 nachgewiesen. Die Sublinien N 361-4 und -5 enthielten das Zielgen nicht.

Zur Quantifizierung der Kopienzahlen, mit der die T-DNA der Transformationsvektoren in den Sublinien vorlagen, wurden Southern Blots (Abb. 3.90) durchgeführt. Hierbei wurden vornehmlich Sublinien mit ein und zwei Kopien der T-DNA identifiziert, allerdings auch jeweils eine Sublinie mit fünf und sieben Kopien (Tab. 3.54).

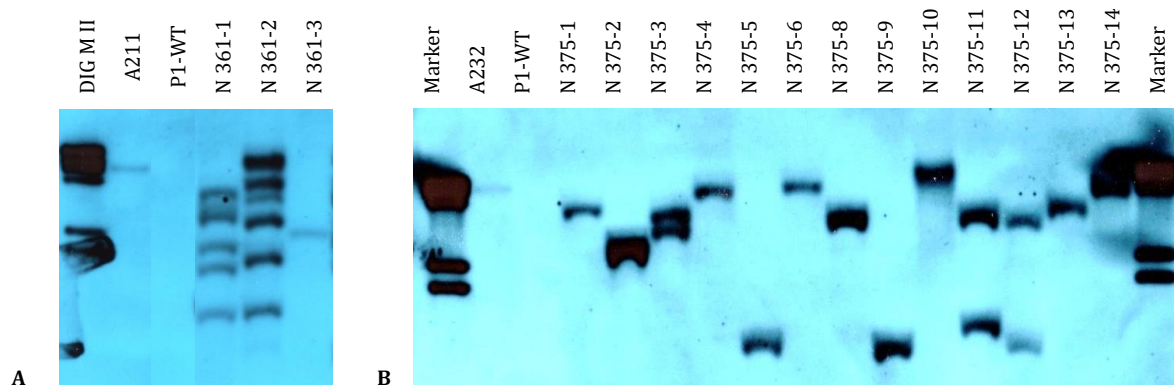


Abb. 3.90: Southern Blots zur Quantifizierung der Kopienzahl in N 361 (A) und in N 375 (B)

Die DNA für diese Southern Blots wurde mit *SspI* restringiert. Die Digoxigenin-markierte Sonde bindet im Markergen *NPTII* und wurde mit den Primern #317 und #318 synthetisiert. Die Sonde ist 780 bp lang. Als Fragmentlängenmarker wurde der DIG-Marker II (Fa. Roche, Mannheim) verwendet.

Tab. 3.54: Ermittelte Kopienzahlen in unabhängigen transgenen Linien von N 375 und N 361

Per Southern Blot-Analyse wurden die Kopienzahlen der T-DNA von A221 (N 361) bzw. A232 (N 375) im Pappelgenom quantifiziert.

Kopienzahlen der T-DNA	Transgene Linien
1	N 361-3 N 375-1, -2, -4, -5, -6, -8, -9, -10, -13, -14
2	N 375-3, -11, -12
5	N 361-1
7	N 361-2

Zur Ermittlung der T-DNA-Integrationsorte und zur Prüfung von möglichen Positionseffekten wurden TAIL-PCRs mit 128-fach bzw. 256-fach degenerierten Primern sowie den spezifischen Primern #1923 für TAIL-PCR I, #1922 für TAIL-PCR II und #1921 für TAIL-PCR III durchgeführt. Die Primer amplifizierten die DNA über die *Left Border* hinaus. Die genomischen Bereiche außerhalb der T-DNA wurden mit einer *BLAST*-Analyse in *P. trichocarpa* und *P. × canescens* (<https://phytozome.jgi.doe.gov>, <http://aspen.db.uga.edu/spta717/Blast>, Zugriff am 22.02.2016) detektiert. Die identifizierten Bereiche sind in Tab. 3.55 zusammengefasst: Für die Linie N 361-1 wurden fünf Sequenzen erhalten, die insgesamt neun Loci zugeordnet werden konnten. Für die Linie N 361-2 wurde lediglich Chromosom 2 als Integrationsort ermittelt. Trotz mehrfacher Versuche konnten keine weiteren Integrationsorte identifiziert werden. Für alle identifizierten Bereiche lagen keine funktionellen Annotierungen vor. Für die Linie N 375-3 wurde Chromosom 2 als Integrationsort ermittelt, für die Linie N 361-4 Chromosom 16. Für beide Bereiche lagen keine funktionellen Annotierungen vor. Auch nach mehrfachen Wiederholungen konnten die Integrationsorte in den Linien N 361-1, -2, -9 und -14 nicht ermittelt werden.

Tab. 3.55: Integrationsorte der transgenen Linie N 361

Die Integrationsorte wurden durch eine *BLAST*-Analyse in den Datenbanksequenzen von *P. trichocarpa* (*Pt*, Version 3.0) und *P. × canescens* (*Pc*, Version 1.1) ermittelt. Die Angaben zu den funktionellen Annotierungen der Loci basieren auf *P. trichocarpa*. Farblich hinterlegt sind die Linien mit signifikant abweichender Gesamthöhe.

Sublinie	Integrationsort	Datenbank-Art	Score <i>Pt (Pc)</i>	E-Wert <i>Pt (Pc)</i>	Funktionelle Annotierung des Integrationslocus
N 361-1	Chromosom 2	<i>Pt, Pc</i>	697,4 (601)	0,0 (4E-170)	ohne funktionelle Annotierung
	Chromosom 19/10	<i>Pt/Pt</i>	104,1	1,3E-21	alle ohne funktionelle Annotierung
	Chromosom 15/13/4	alle <i>Pt, Pc</i>	alle 944,4 (alle 996)	0,0 (0,0)	alle ohne funktionelle Annotierung
	Chromosom 13	<i>Pt, Pc</i>	472,0 (473)	9,4E-132 (3E-132)	ohne funktionelle Annotierung
	Scaffold 36	<i>Pt, Pc</i>	196,1 (185)	5,9E-49 (7E-46)	ohne funktionelle Annotierung
N 361-2	Chromosom 2	<i>Pt, Pc</i>	118,5 (95,3)	3,2E-25 (3E-18)	ohne funktionelle Annotierung
N 375-3	Chromosom 2	<i>Pt, Pc</i>	118,5 (95,3)	2,3E-25 (2E-18)	ohne funktionelle Annotierung
N 375-4	Chromosom 16	<i>Pt, Pc</i>	217,7 (231)	3,5E-55 (2E-59)	ohne funktionelle Annotierung

Phänotypisierung

Zur Analyse der Pflanzen unter naturnahen Bedingungen außerhalb der Gewebekultur wurden von den Sublinien N 361-1 und N 361-2 sowie elf Sublinien von N 375 einzelne Pappeln zusammen mit nicht-transgenen Kontrollpflanzen ins Gewächshaus überführt und hier kultiviert.

Nach acht und 18 Monaten wurde die Gesamthöhe gemessen. Die transgenen Sublinien N 361-1 und N 361-2 waren in beiden Messungen signifikant kleiner als ihre Kontrollpflanzen ($p \leq 0,02$, Tab. 3.56, Abb. 3.91 und 3.92).

Tab. 3.56: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linie N 361 im Gewächshaus

Die Gesamthöhe der Pappeln wurde nach acht- bzw. 18-monatiger Kultivierung erhoben. Eine signifikante Mittelwertabweichung ($p \leq 0,05$) wurde von den transgenen Pflanzen beider Sublinien erreicht ($p \leq 0,02$).

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standard- abweichung [cm]	p	Signifikanz
8 Monate Kultur, eine Vegetationsperiode						
Kontrollen	9	104	103	7		
N 361-1	5	51	47	15	0,00	ja, signifikant kleiner
N 361-2	8	83	85	18	0,02	ja, signifikant kleiner
18 Monate Kultur, zwei Vegetationsperioden						
Kontrollen	9	241	244	13		
N 361-1	4	149	150	39	0,02	ja, signifikant kleiner
N 361-2	7	188	198	28	0,00	ja, signifikant kleiner

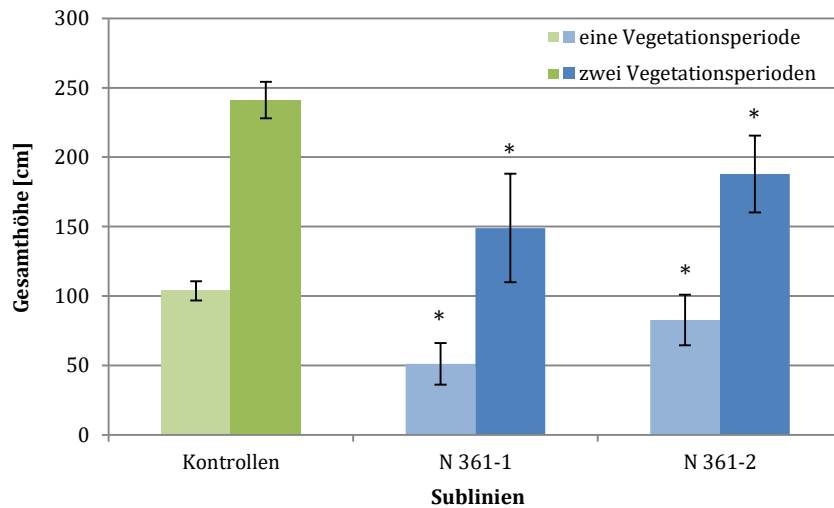


Abb. 3.91: Mittelwertvergleich der Gesamthöhenmessungen von N 361

Im Vergleich zu den nicht-transgenen Kontrollpflanzen waren beide Sublinien nach einer sowie nach zwei Vegetationsperioden signifikant kleiner (markiert mit *, $p \leq 0,02$). Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an.



Abb. 3.92: Höhenunterschiede der transgenen Linie N 361

Die transgenen Linien N 361-1 (A) und N 361-2 (B) waren signifikant kleiner als ihre Kontrollen. Von beiden Linien sind jeweils die kleinste, die mediane und die größte Pflanze mit der medianen Kontrollpflanze am Ende der zweiten Vegetationsperiode abgebildet.

Nach sechsmonatiger Kultivierung wurde die Gesamthöhe der Pappeln von N 375 gemessen. Dabei wurden N 375-1 als signifikant größer ($p = 0,01$) sowie N 375-14 als signifikant kleiner ($p = 0,03$) ermittelt (Tab. 3.57, Abb. 3.93).

Tab. 3.57: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linie N 375 im Gewächshaus

Die Gesamthöhen der Pappeln wurden nach sechsmonatiger Kultivierung erhoben. Eine signifikante Mittelwertabweichung wurde bei $p \leq 0,05$ angenommen. Dieser Wert wurde von den Linien N 375-1 ($p = 0,01$) und N 375-14 ($p = 0,03$) unterschritten.

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standardabweichung [cm]	p	Signifikanz
Kontrollen	10	92	89	16		
N 375-1	13	114	115	18	0,01	ja, signifikant größer
N 375-2	10	105	115	20	0,13	nein
N 375-4	10	94	101	29	0,83	nein
N 375-5	7	90	98	22	0,92	nein
N 375-6	9	95	101	34	0,78	nein
N 375-8	9	93	88	18	0,89	nein
N 375-9	8	96	91	25	0,72	nein
N 375-10	9	95	97	15	0,64	nein
N 375-11	10	110	121	31	0,14	nein
N 375-13	9	96	110	25	0,67	nein
N 375-14	7	59	64	29	0,03	ja, signifikant kleiner

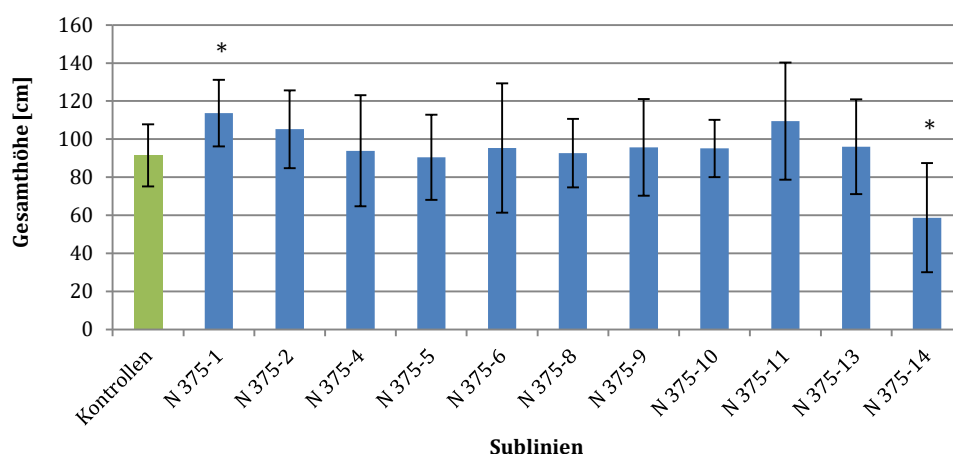


Abb. 3.93: Mittelwertvergleich der Gesamthöhenmessungen von N 375

Die Sublinie N 375-1 war signifikant größer ($p = 0,01$), N 375-14 signifikant kleiner ($p = 0,03$, beide mit * markiert). Die anderen Linien zeigten kein signifikant abweichendes Wachstum. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an.

Holzchemische Analysen

Von der Linie N 361 wurden die Pflanzen 19081 und 19084 (beide N 361-1) sowie 19088 und 19091 (beide N 361-2) zusammen mit den nicht-transgenen Kontrollpflanzen 19072 und 19073 vom Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung (Potsdam, K. Hettrich) auf ihre Biomassezusammensetzung untersucht. Die transgenen Pflanzen wiesen einen signifikant höheren Proteinanteil auf als die Kontrollpflanzen (Tab. 3.58). Eine Veränderung in den drei Hauptbestandteilen Lignin, Cellulose und Hemicellulose wurde nicht festgestellt.

Tab. 3.58: Prozentuale chemische Zusammensetzung des Sprossgewebes der Linien N 361-1 und N 361-2

Die Mittelwerte M der einzelnen Bestandteile wurden aus zwei Individuen berechnet. Sie entsprachen etwa den Mittelwerten der nicht-transgenen Kontrollpflanzen. Signifikante Abweichungen ($p \leq 0,05$) lagen lediglich beim Proteingehalt der beiden transgenen Linien vor (mit * markiert). Die Werte lagen durchschnittlich mit 2,4% bzw. 2,0% um 0,9% bzw. 0,5% höher als bei den nicht-transgenen Kontrollen. Die Analysen wurden am Fraunhofer IAP durchgeführt (K. Hettrich). Abkürzungen: M - Mittelwert, s - Standardabweichung, p - Irrtumswahrscheinlichkeit für signifikante Abweichung.

Bestandteile	Transgene Pflanzen der Linie N 361						Nicht-transgene Kontrollen	
	N 361-1			N 361-2			M	s
	M	s	p	M	s	p	M	s
Asche	2,3	0,0	0,11	2,3	0,2	0,31	2,0	0,1
Protein	2,4	0,1	0,01 *	2,0	0,0	0,02 *	1,5	0,0
Ethanol-Extraktstoffe	15,3	0,6	0,69	15,8	0,1	0,33	15,6	0,1
Cellulose	31,5	0,3	0,22	32,6	0,5	0,66	33,0	0,6
Hemicellulose	21,9	0,3	0,47	21,9	0,4	0,56	22,3	0,2
Lignin	20,2	0,4	0,58	19,2	0,5	0,44	19,8	0,0

3.3 Doppeltransformationen zur parallelen Überexpression von zwei Kandidatengenen

Um Hinweise auf mögliche Kombinationseffekte zu gewinnen, wurden fünf Doppeltransformationen zur Überexpression verschiedener Kandidatengene durchgeführt. Entweder wurden die zwei Transformationen zeitlich parallel angesetzt oder nacheinander, indem eine transgene Pappellinie als Empfängerorganismus für eine weitere Transformation genutzt wurde. Die folgenden drei Kombinationen wurden durchgeführt:

Überexpression von Potri.002G034400 und Potri.007G008600,

Überexpression von Potri.002G034400 und Potri.002G223100 sowie

Überexpression von Potri.019G084600 und Potri.007G008600.

Die Doppeltransformationen führten zu keinen konsistenten Phänotypänderungen. Ein einzelner, besonders auffälliger Phänotyp entstand mit der Sublinie N 406-7, für den wahrscheinlich transiente Agrobakterien verantwortlich waren.

3.3.1 Potri.002G034400 und Potri.007G008600

Zur parallelen Überexpression von Potri.002G034400 und Potri.007G008600 wurden die Doppeltransformationen N 405 und N 412 durchgeführt. Für N 405 wurden die beiden Transformationsvektoren A185 und A194 verwendet. Sie kodierten für die Überexpression von Potri.002G034400 bzw. Potri.007G008600 und die Resistenzgene *HPT* bzw. *NPTII* zur Selektion. Empfängerorganismus dieser Transformation war der nicht-transgene *P. × canescens*-Klon P1. Als Empfängerorganismus der Transformation N 412 wurde der transgene Klon N 311-11 verwendet, der zuvor mit dem Vektor A194 transformiert wurde. Diese einfach transgene Linie wurde nun zusätzlich mit dem Vektor A185 transformiert.

Molekulargenetische Untersuchungen

Aus den beiden Transformationen wurden 14 putativ transgene Sublinien herangezogen. Der Transformationserfolg wurde bei allen Linien auf molekulargenetischer Ebene überprüft, wie im Folgenden exemplarisch für N 405 gezeigt wird. Per PCR und anschließender Gelelektrophorese wurde die Anwesenheit der beiden Selektionsmarkers *NPTII* und *HPT* überprüft. Die Kanamycinresistenz *NPTII* wurde in den Linien N 405-1 bis -9 sowie N 405-12 nachgewiesen, N 405-10 und -11 enthielten sie nicht. Die Hygromycinresistenz *HPT* wurde in den Linien N 405-3 bis -9 sowie N 405-11 und -12 nachgewiesen, allerdings nicht in N 405-1, -2 und -10 (Abb. 3.94). Beide Resistenzgene wurden zudem in den Sublinien N 412-2 und -3 nachgewiesen.

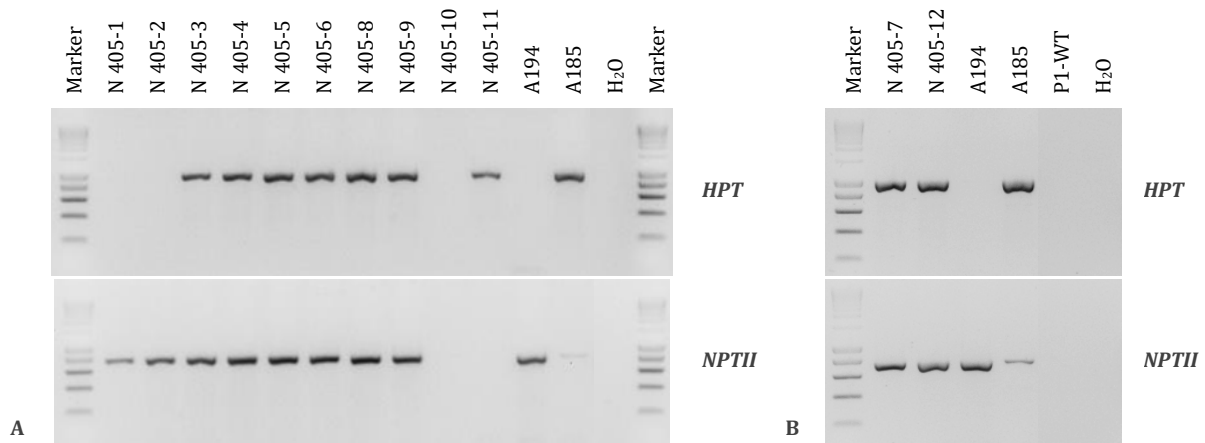


Abb. 3.94: Gelelektrophoretischer Nachweis der Selektionsmarker *HPT* und *NPTII*

Die PCRs wurden mit den Primern #337 und #338 zum Nachweis von *HPT* sowie #343 und #344 zum Nachweis von *NPTII* durchgeführt. Die *Annealing*-Temperaturen in den PCRs lagen bei 58 °C (*HPT*, A) und 62 °C (*HPT*, B) bzw. 60 °C (*NPTII*, A) und 58 °C (*NPTII*, B). Es wurden 37 Amplifikationszyklen absolviert. 5 µL der PCR-Produkte wurden auf einem 1,5% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt.

Alle Sublinien wurden anschließend auf die Anwesenheit der Zielgene überprüft. Hierfür wurden PCRs mit den Primerpaaren #1191 und #1361 zum Nachweis von Potri.002G034400 bzw. #1448 und #1361 zum Nachweis von Potri.007G008600 durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Potri.002G034400 wurde in allen getesteten Linien nachgewiesen (Abb. 3.95). Potri.007G008600 wurde mit Ausnahme von N 405-11 ebenfalls in allen Linien nachgewiesen (Abb. 3.96). Auch in den Linien N 412-2 und -3 wurden die Zielsequenzen beider Gene nachgewiesen.

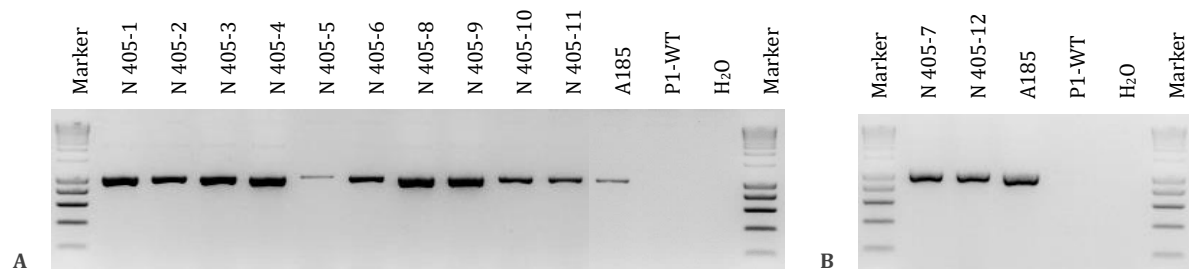


Abb. 3.95: Gelelektrophoretischer Nachweis des Zielgens Potri.002G034400

Die PCRs wurden mit dem Primerpaar #1191 und #1361 bei einer *Annealing*-Temperatur von 54 °C und mit 37 Amplifikationszyklen durchgeführt. 5 µL der PCR-Produkte wurden auf einem 1,5% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. Das Zielgen Potri.002G034400 wurde in allen zwölf Sublinien nachgewiesen.

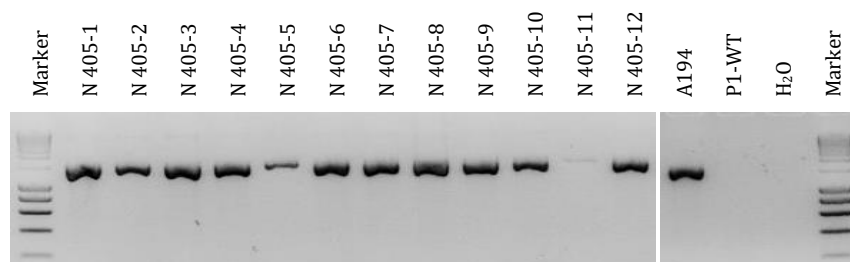


Abb. 3.96: Gelelektrophoretischer Nachweis des Zielgens Potri.007G008600

Die PCR wurde mit dem Primerpaar #1448 und #1361 bei einer *Annealing*-Temperatur von 53 °C und mit 37 Amplifikationszyklen durchgeführt. 5 µL der PCR-Produkte wurden auf einem 1,5% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. Das Zielgen Potri.007G008600 wurde außer in N 405-11 in den übrigen elf Sublinien nachgewiesen.

Zur Quantifizierung der Kopienanzahl in den ausgewählten transgenen Linien, mit der die T-DNA von A185 bzw. A194 vorlag, wurde jeweils ein Southern Blot mit der Sonde für *HPT* und *NPTII* durchgeführt (Abb. 3.97). Die ermittelten Kopienzahlen sind in Tab. 3.59 zusammengefasst.

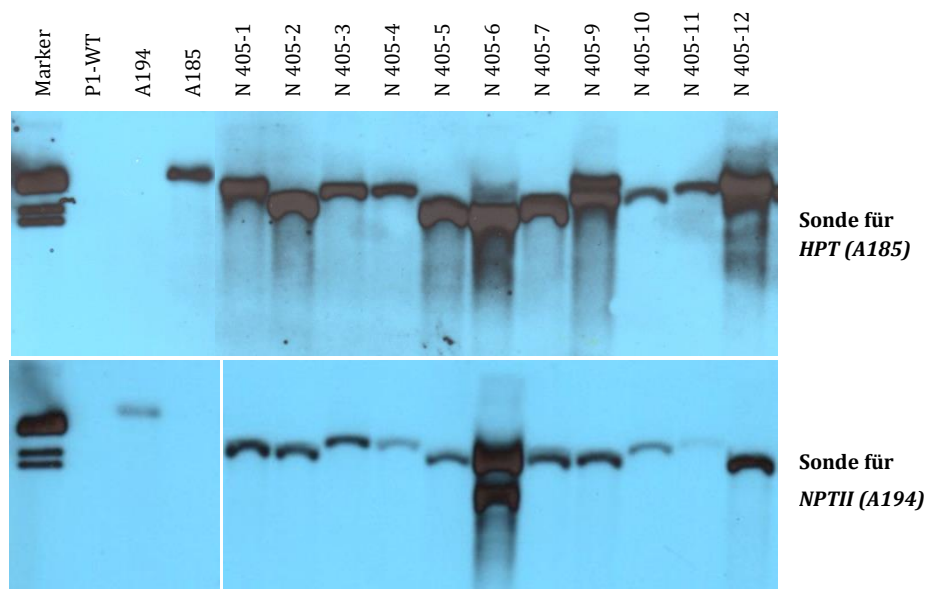


Abb. 3.97: Southern Blot zur Quantifizierung der Kopienanzahl in N 405

Die DNA für dieses Southern Blot wurde mit *SacI* restringiert. Die Membran wurde zunächst mit der Digoxigenin-markierte Sonde für *NPTII* hybridisiert, anschließend einem Stripping unterzogen und mit der Sonde für *HPT* hybridisiert. Die Sonden wurden mit den Primern #317 und #318 (*NPTII*) bzw. #337 und #338 (*HPT*) synthetisiert. Die Sonden waren 780 bp bzw. 988 bp lang. Als Fragmentlängenmarker wurde der DIG-Marker II (Fa. Roche, Mannheim) verwendet.

Tab. 3.59: Ermittelte Kopienzahlen in unabhängigen transgenen Linien von N 405 und N 412

Per Southern Blot-Analysen wurden die Kopienzahlen der T-DNA von A185 und A194 im Pappelgenom quantifiziert.

Sublinien	T-DNA von A185	T-DNA von A194
N 405-1	1	1
N 405-2	1	1
N 405-3	1	1
N 405-4	1	1
N 405-5	1	1
N 405-6	1	4
N 405-7	1	2
N 405-9	2	1
N 405-10	1	1
N 405-11	1	1
N 405-12	1	1
N 412-2	1	1
N 412-3	1	1

Nach Überprüfung der Resistenzmarker wurden die Linien N 405-1, -2, -10 und -11 verworfen, die nicht oder nur einfach transgen waren. Die doppeltransgenen Sublinien N 405-3, -4, -5, -6, -8 und -9 sowie N 412-2 und -3 wurden weiter bearbeitet.

Zur Ermittlung der T-DNA-Integrationsorte und zur Prüfung von möglichen Positionseffekten wurden für mehrere Sublinien von N 405 TAIL-PCRs mit 128-fach bzw. 256-fach degenerierten Primern durchgeführt. Als spezifische Primer wurden für Potri.002G034400 #1755 (TAIL-PCR I), #1754 (TAIL-PCR II) und #1753 (TAIL-PCR III) verwendet, für Potri.007G008600 die Primer #2015 (TAIL-PCR I), #2016 (TAIL-PCR II) und #2017 (TAIL-PCR III). Die Primer amplifizierten die DNA über die *Right Border* hinaus. Die genomischen Bereiche außerhalb der T-DNA wurden mit einer *BLAST*-Analyse in *P. trichocarpa* und *P. × canescens* detektiert (<https://phytozome.jgi.doe.gov>, <http://aspendb.uga.edu/spta717/Blast>, Zugriff am 09.05.2016). Die identifizierten Bereiche sind in Tab. 3.60 zusammengefasst. Trotz mehrfacher Versuche konnten die Integrationsorte von N 405-2, -6 und -7 nicht geklärt werden.

Tab. 3.60: Integrationsorte der transgenen Linie N 405

Die Integrationsorte wurden durch eine *BLAST*-Analyse in den Datenbanksequenzen von *P. trichocarpa* (*Pt*, Version 3.0) und *P. × canescens* (*Pc*, Version 1.1) ermittelt. Die Angaben zu den funktionellen Annotierungen der Loci basieren auf *P. trichocarpa*. Farblich hinterlegt sind die Linien mit signifikant abweichender Gesamthöhe. A beschreibt den Integrationsort der T-DNA zur Überexpression von Potri.002G034400, B von Potri.007G008600.

Sublinie	Integrationsort	Datenbank-Art	Score <i>Pt</i> (<i>Pc</i>)	E-Wert <i>Pt</i> (<i>Pc</i>)	Funktionelle Annotierung des Integrationslocus
N 405-1	A Chromosom 2	<i>Pt, Pc</i>	273,6 (315)	3,1E-72 (1E-84)	Potri.002G034200 (3' UTR)
	B nicht ermittelt				
N 405-4	A nicht ermittelt				
	B Chromosom 7	<i>Pt, Pc</i>	394,4 (457)	2E-127 (1,8E-108)	Potri.007G008700 (Exon)
N 405-9	A Chromosom 9	<i>Pt, Pc</i>	51,8 (73,1)	1,6E-5 (6E-12)	Potri.009G098000 (3' UTR)
	B nicht ermittelt				

Das Gen Potri.002G034200 war auch als Pt-RER1.5 annotiert (<https://phytozome.jgi.doe.gov>, Zugriff am 09.05.2016) und ist damit ein Mitglied der RER1-Familie. Diese Genfamilie wurde in *A. thaliana* eingehend bearbeitet. RER1-Proteine sind in der Membran des Golgi-Apparats lokalisiert und für die Rückgewinnung von ER-Proteinen verantwortlich, die vom Endoplasmatischen Retikulum an den Golgi-Apparat abgegeben und dann anschließend zurückgeführt werden (Sato *et al.* 1999).

Das Gen Potri.007G008700 war nicht annotiert (<https://phytozome.jgi.doe.gov>, Zugriff am 09.05.2016).

Bei Potri.009G098000 handelte es sich um eine Protein-Serin/Threonin-Phosphatase (<https://phytozome.jgi.doe.gov>, Zugriff am 09.05.2016).

Phänotypisierung

Zur Analyse der Pflanzen unter naturnahen Bedingungen außerhalb der Gewebekultur wurden zahlreiche Pflanzen von ausgewählten Sublinien von N 405 und N 412 zusammen mit nicht-transgenen Kontrollpflanzen ins Gewächshaus überführt und hier kultiviert. Nach elf Monaten wurde die Gesamthöhe der Pappeln gemessen und N 405-1 als signifikant kleiner ($p = 0,05$, Abb. 3.99) ermittelt. Alle anderen Sublinien zeigten keine signifikante Höhenabweichung (Tab. 3.61, Abb. 3.98).

Tab. 3.61: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linie N 405 im Gewächshaus

Die Gesamthöhen der Pappeln wurde nach elfmonatiger Kultivierung erhoben. Bei Linie N 405-1 wurde eine signifikante Mittelwertabweichung beobachtet; Die Pflanzen waren signifikant kleiner ($p = 0,05$). Weitere signifikante Abweichungen wurden nicht beobachtet.

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standard-abweichung [cm]	p	Signifikanz
Kontrolle	5	253	255	21		
N 405-1	9	216	203	35	0,05	ja, signifikant kleiner
N 405-2	9	241	254	25	0,43	nein
N 405-4	9	231	232	27	0,17	nein
N 405-6	8	228	239	22	0,10	nein
N 405-7	8	229	222	34	0,19	nein
N 405-9	4	233	233	40	0,48	nein

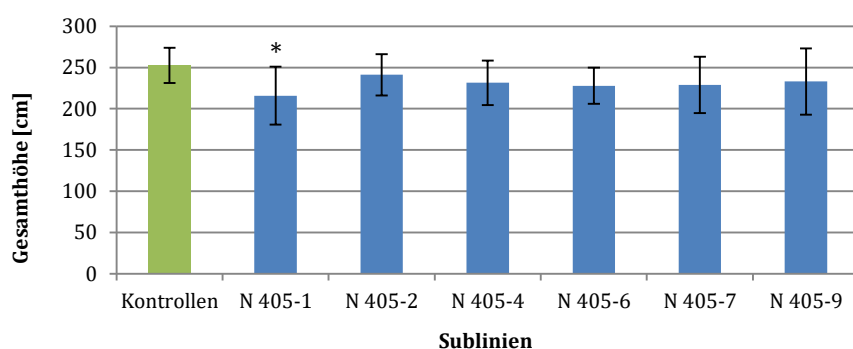


Abb. 3.98: Mittelwertvergleich der Gesamthöhenmessungen von N 405

Die Sublinie N 405-1 war signifikant kleiner als die nicht-transgenen Kontrollpflanzen ($p = 0,05$, mit * markiert). Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an.



Abb. 3.99: Exemplarische Sublinien der Linie N 405 im Vergleich zum nicht-transgenen Wildtyp

Von den Linien N 405-1, N 405-2 und N 405-6 sind jeweils die kleinste, die mediane und die größte Pflanze zusammen mit der medianen Kontrollpflanze abgebildet. Die Pappeln der Linie N 405-1 waren signifikant kleiner als die Wildtypen (markiert mit *).

Die Pappeln der Linie N 412-2 und -3 wurden für acht Monate kultiviert. Eine signifikante Mittelwertabweichung ($p \leq 0,05$) der Linien wurde nicht beobachtet (Tab. 3.62).

Tab. 3.62: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linie N 412 im Gewächshaus

Die Pappeln wurden für acht Monaten kultiviert, anschließend wurden ihre Gesamthöhen gemessen. Eine signifikante Mittelwertabweichung ($p \leq 0,05$) wurde nicht beobachtet.

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standardabweichung [cm]	p	Signifikanz
Kontrollen	7	210	205	28		
N 412-2	7	207	215	36	0,90	nein
N 412-3	5	208	210	20	0,94	nein

3.3.2 Potri.002G034400 und Potri.002G223100

Zur parallelen Überexpression von Potri.002G034400 und Potri.002G223100 wurden die Doppeltransformationen N 406 und N 411 durchgeführt. Für N 406 wurden die beiden Transformationsvektoren A185 und A200 verwendet. Sie kodierten für die Überexpression von Potri.002G034400 bzw. Potri.002G223100 und die Resistenzen *HPT* bzw. *NPTII* zur Selektion. Empfängerorganismus dieser Transformation war der nicht-transgene *P. × canescens*-Klon P1. Als Empfängerorganismus der Transformation N 411 wurde der transgene Klon N 282-7 verwendet, der zuvor mit dem Vektor A185 transformiert wurde. Diese einfach transgene Linie wurde nun zusätzlich mit dem Vektor A200 transformiert.

Molekulargenetische Untersuchungen

Aus den beiden Transformationen wurden 15 putativ transgene Sublinien herangezogen. Per PCR und anschließender Gelelektrophorese wurde die Anwesenheit der beiden Selektionsmarkers *NPTII* und *HPT* in N 406 überprüft (Abb. 3.100). Sowohl die Kanamycinresistenz *NPTII* als auch die Hygromycinresistenz *HPT* wurden in den Linien N 406-1, -2, -3, -6 und -7 nachgewiesen. Auch die zunächst langsam wachsenden und daher später analysierten Linien N 406-4 und -5 wiesen beide Resistenzmarker auf (ohne Abbildung).

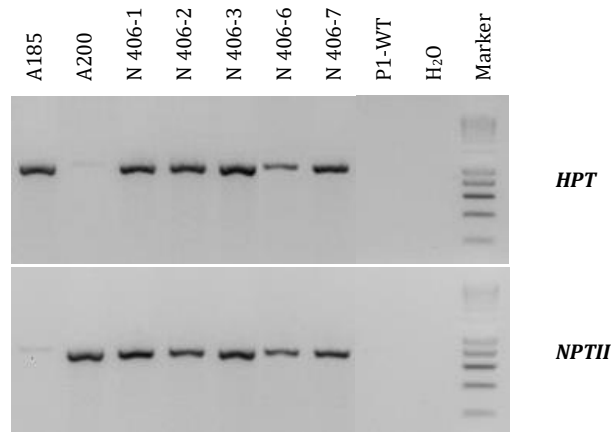


Abb. 3.100: Gelelektrophoretischer Nachweis der Selektionsmarker *HPT* und *NPTII*

Die PCRs wurden mit den Primern #337 und #338 (*HPT*) bzw. #343 und #344 (*NPTII*) bei einer *Annealing*-Temperatur von 58 bzw. 62 °C und mit 37 Amplifikationszyklen durchgeführt. 5 µL der PCR-Produkte wurden auf einem 1,5% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. Der Nachweis beider Resistenzmarker in den Linien N 406-4 und -5 wurde in einer weiteren PCR erbracht (ohne Abbildung). Die Resistenzgene wurden somit in allen getesteten Linien nachgewiesen.

In N 411 wurde nur die Anwesenheit des Selektionsmarkers *NPTII* überprüft. Die Anwesenheit der Hygromycinresistenz wurde hier nicht getestet, sondern vorausgesetzt, da das Empfängermaterial N 282-7 positiv auf diese Resistenz getestet wurde. Zudem wurde im Folgenden das mit dieser Resistenz gemeinsam transformierte Zielgen per PCR überprüft. Die Kanamycinresistenz wurde in den Linien N 411-1, -2, -5, -7, -8 und -10 nachgewiesen. Das Ergebnis der Linien N 411-4, -6 und -9 war negativ (Abb. 3.101).

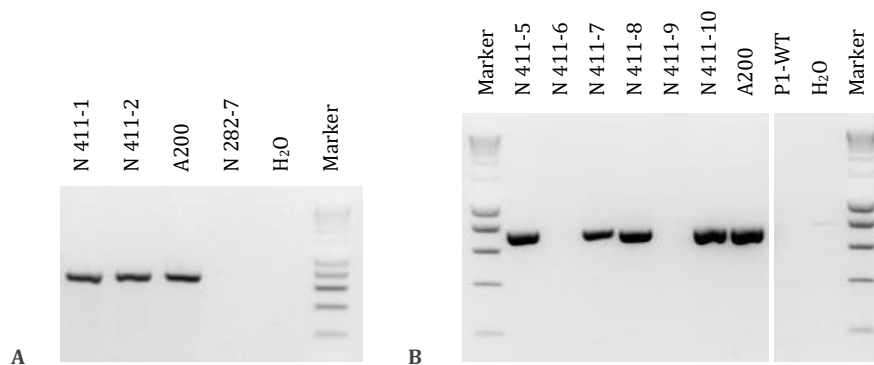


Abb. 3.101: Gelelektrophoretischer Nachweis des Selektionsmarkers *NPTII*

Die PCR wurde mit den Primern #343 und #344 bei einer *Annealing*-Temperatur von 60 °C (A) bzw. 62 °C (B) und mit 37 (A) bzw. 40 (B) Amplifikationszyklen durchgeführt. 5 µL der PCR-Produkte wurden auf einem 1,5% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. Der Selektionsmarker wurde in N 411-1 und -2 (A) sowie N 411-5, -7, -8 und -10 (B) nachgewiesen. N 411-4 enthielt das Kanamycin-Resistenzgen nicht (ohne Abbildung).

Alle Sublinien wurden anschließend auf die Anwesenheit der beiden Zielgene überprüft, wie im Folgenden für N 406 gezeigt wird. Hierfür wurde jeweils eine PCR mit den Primerpaaren #1191 und #1361 für Potri.002G034400 bzw. #1197 und #1361 für Potri.002G223100 durchgeführt und die PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 3.102). In allen sieben getesteten Sublinien von N 406 konnten

beide Zielgene amplifiziert werden. Da Sublinie N 406-3 im weiteren Verlauf abstarb, wurde sie nicht weiter analysiert. In N 411-1, -2, -5, -7, -8, -9 und -10 wurde das Zielgen Potri.002G223100 amplifiziert, in N 411-9 allerdings nur schwach. In N 411-4 und -6 wurde das Gen nicht nachgewiesen. Das zweite Zielgen Potri.002G034400 wurde in allen getesteten Sublinien nachgewiesen. Die Linie N 411-1 starb im weiteren Bearbeitungsverlauf ab, sodass diese Linie in den folgenden Analysen nicht mehr berücksichtigt wurde.

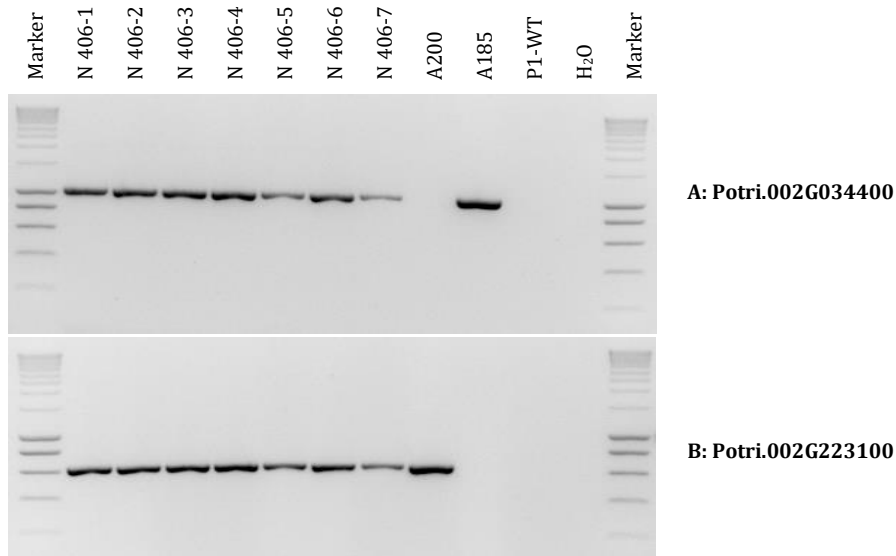


Abb. 3.102: Gelelektrophoretischer Nachweis der Zielgene

Die PCRs wurden mit den Primern #1191 und #1361 (A) bzw. #1197 und #1361 (B) bei einer *Annealing*-Temperatur von 53 °C und mit 37 Amplifikationszyklen durchgeführt. 5 µL der PCR-Produkte wurden auf einem 1,3% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt.

Zur Quantifizierung der Kopienanzahl, mit der die T-DNA von A185 und A200 ins Pappelgenom der transgenen Linien integriert wurde, ist jeweils ein Southern Blot mit der Sonde für *HPT* und *NPTII* durchgeführt worden, das exemplarisch für N 406 abgebildet ist (Abb. 3.103). Die einzelnen Kopienzahlen sind in Tab. 3.63 zusammengefasst. Während in N 406-7 eindeutige PCR-Ergebnisse erhalten wurden, waren die Banden in den Southern Blots von dieser Sublinie nur sehr schwach erkennbar. Sie lagen über den Banden der übrigen Sublinien auf Höhe der Positivkontrollen.

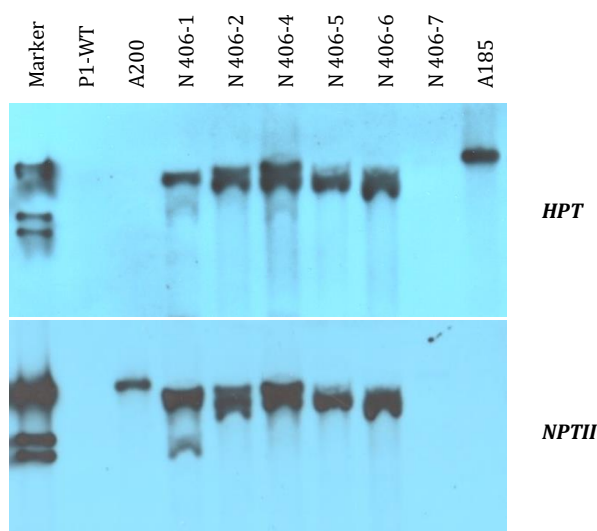


Abb. 3.103: Southern Blot zur Quantifizierung der Kopienanzahl in N 406

Die DNA für dieses Southern Blot wurde mit *SacI* restringiert. Die Membran wurde zunächst mit der Digoxigenin-markierte Sonde für *NPTII* hybridisiert, anschließend einem Stripping unterzogen und mit der Sonde für *HPT* hybridisiert. Die Sonden wurden mit den Primern #337 und #338 (*HPT*) bzw. #317 und #318 (*NPTII*) synthetisiert. Die Sonden waren 988 bp bzw. 780 bp lang. Als Fragmentlängenmarker wurde der DIG-Marker II (Fa. Roche, Mannheim) verwendet. Die Banden von N 406-7 lagen auf der Höhe der Positivkontrollen A200 bzw. A185 und waren nur schwach erkennbar.

Tab. 3.63: Ermittelte Kopienzahlen in unabhängigen transgenen Linien von N 406 und N 411

Per Southern Blot-Analyse wurden die Kopienzahlen der T-DNA von A185 und A200 im Pappelgenom quantifiziert. In N 406-7 (mit * markiert) wurden nur schwache Banden erhalten, die auf der Höhe der Positivkontrollen lagen.

Sublinien	T-DNA von A185	T-DNA von A200
N 406-1	1	2-3
N 406-2	2	3
N 406-4	2	2
N 406-5	1	1
N 406-6	1	1
N 406-7	1*	1*
N 411-2	1	1
N 411-5	1	1
N 411-7	1	1
N 411-8	1	1
N 411-10	1	1

Phänotypisierung

Zur Analyse der Pflanzen unter naturnahen Bedingungen außerhalb der Gewebekultur wurden zahlreiche Pflanzen von ausgewählten Sublinien von N 406 und N 411 zusammen mit nicht-transgenen Kontrollpflanzen ins Gewächshaus überführt und hier kultiviert. Nach neun bzw. sechs Monaten wurde die Gesamthöhe der Pappeln von N 406 gemessen. Signifikante Abweichungen ($p \leq 0,05$) der Mittelwerte wurden dabei nicht festgestellt (Tab. 3.64).

Tab. 3.64: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linie N 406 im Gewächshaus

Die Gesamthöhe der Pappeln wurden nach neun- bzw. sechsmonatiger Kultivierung erhoben. Eine signifikante Mittelwertabweichung ($p \leq 0,05$) wurde nicht festgestellt.

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standardabweichung [cm]	p	Signifikanz
9 Monate Kultur, eine Vegetationsperiode						
Kontrollen	10	239	250	27		
N 406-1	7	229	241	27	0,52	nein
N 406-2	2	256	256	14	0,41	nein
N 406-4	4	229	239	41	0,71	nein
N 406-5	8	222	216	25	0,22	nein
6 Monate Kultur, eine Vegetationsperiode						
Kontrollen	4	111	116	21		
N 406-6	6	115	113	15	0,78	nein

Einen phänotypischen Sonderfall stellte die Linie N 406-7 dar, dessen Pflanzen in der *in vitro*-Kultur ein stark abweichendes Wachstum zeigten. Sie produzierten Kallusgewebe, jedoch keine Wurzeln oder Sprosse (Abb. 3.104). Auch auf Thidiazuron-haltigem Medium wurde keine multiple Sprossung beobachtet. Klone dieser Sublinie konnten daher nicht ins Gewächshaus überführt werden. Zur Überprüfung eines möglichen Positionseffektes wurden mehrfach TAIL-PCRs durchgeführt, die allerdings nicht zur Klärung des Integrationsortes führten.

Per PCR wurden sowohl beide Resistenzgene (Abb. 3.100) als auch beide Zielgene (Abb. 3.102) nachgewiesen, allerdings waren die Banden von N 406-7 in den Southern Blots nur sehr schwach erkennbar (Abb. 3.103). Die Banden lagen in beiden Southern Blots jeweils auf der Höhe der verwendeten Positivkontrollen. Der Phänotyp und die zuvor beschriebenen molekulargenetischen Untersuchungsergebnisse resultierten wahrscheinlich aus transienten Agrobakterien, deren DNA zusammen mit der Pappel-DNA extrahiert wurde. Die transienten Bakterien vermittelten einen gewissen Grad der Resistenz, sodass die Pflanzenzellen auf dem Selektionsmedium nicht abstarben, allerdings waren die Pflanzenzellen nicht so vital, dass sie vollständig in unterschiedliche Gewebe differenzierten.

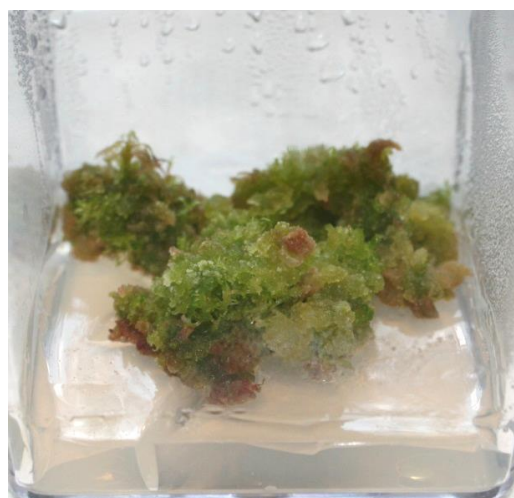


Abb. 3.104: Sublinie N 406-7 in der Gewebekultur

Regenerate der Sublinie N 406-7 zeigten *in vitro* auf Selektionsmedium mit Kanamycin und Hygromycin einen auffälligen Phänotyp. Der Klon vermehrte sich als Kallusgewebe. Trotz Thidiazuron-haltigem Medium kam es zu keiner multiplen Sprossung. Vermutlich wurde der Phänotyp von transienten Agrobakterien ausgelöst.

Nach sechs- bzw. achtmonatiger Kultur, am Ende der Vegetationsperiode, wurden die Gesamthöhen der Pappeln von N 411 gemessen (Tab. 3.65). Hierbei wurden keine signifikanten Mittelwertabweichungen ermittelt.

Tab. 3.65: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linie N 411 im Gewächshaus

Die Gesamthöhen der Pappeln wurden nach acht- bzw. sechsmonatiger Kultur gemessen. Signifikante Mittelwertabweichungen ($p \leq 0,05$) wurden nicht beobachtet.

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standardabweichung [cm]	p	Signifikanz
8 Monate Kultur, eine Vegetationsperiode						
Kontrollen	6	190	181	19		
N 411-2	6	179	179	33	0,56	nein
6 Monate Kultur, eine Vegetationsperiode						
Kontrollen	7	131	129	25		
N 411-5	8	144	146	23	0,35	nein
N 411-7	9	145	144	20	0,28	nein
N 411-8	4	131	125	13	1,00	nein
N 411-10	8	134	138	14	0,79	nein

3.3.3 Potri.019G084600 und Potri.007G008600

Zur parallelen Überexpression von Potri.019G084600 und Potri.007G008600 wurde die Doppeltransformation N 410 durchgeführt. Als Empfängerorganismus wurde der transgene Klon N 327-4 verwendet, der zuvor mit dem Vektor A201 transformiert wurde und für die Überexpression von Potri.019G084600 und die Hygromycinresistenz *HPT* zur Selektion kodierte. Diese einfach transgene Linie wurde nun zusätzlich mit dem Vektor A194 transformiert, der für die Überexpression von Potri.007G008600 und die Kanamycinresistenz *NPTII* zur Selektion kodierte.

Molekulargenetische Untersuchungen

Aus der Transformation wurden 14 putativ transgene Sublinien herangezogen. Per PCR und anschließender Gelelektrophorese wurde die Anwesenheit der beiden Selektionsmarker *NPTII* und *HPT* überprüft. Die Kanamycinresistenz wurde in den Linien N 410-1, -4, -7, -9, -11 und -14 nachgewiesen. Alle übrigen acht Linien waren negativ. Die Hygromycinresistenz *HPT* wurde aufgrund des transgenen Empfängermaterials erwartungsgemäß in allen Linien nachgewiesen (Abb. 3.105).

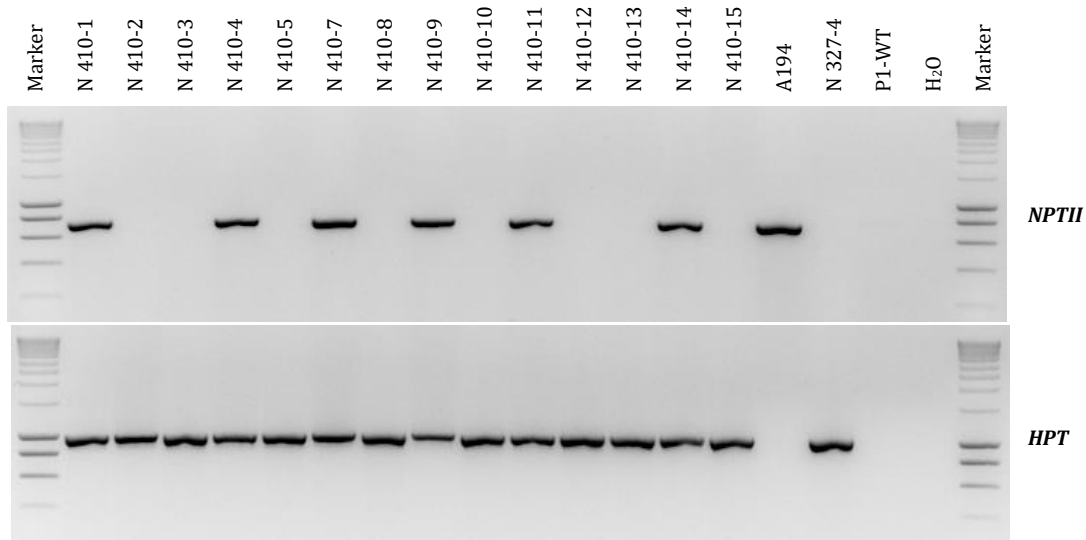


Abb. 3.105: Gelelektrophoretischer Nachweis der Selektionsmarker *NPTII* und *HPT*

Die PCRs wurden mit den Primern #343 und #344 zum Nachweis von *NPTII* sowie #337 und #338 zum Nachweis von *HPT* durchgeführt. Die *Annealing*-Temperatur in den PCRs lag bei 62 °C (*NPTII*) bzw. 58 °C (*HPT*). Es wurden 37 Amplifikationszyklen absolviert. Die Elektrophorese wurde mit einem 1,3% Agarose-TBE-Gel durchgeführt. In sechs der Sublinien wurde das Kanamycin-Resistenzgen nachgewiesen. Da das Empfängermaterial über das Hygromycin-Resistenzgen verfügte, wurde es in allen getesteten Sublinien detektiert.

Alle Sublinien wurden anschließend auf die Anwesenheit des Zielgens Potri.007G008600 überprüft. Hierfür wurde eine PCR mit dem Primerpaar #1448 und #1361 durchgeführt und die PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 3.106). In N 410-1, -4, -7, -9, -11 und -14 konnte das Zielgen amplifiziert werden, was dem Testergebnis für den Resistenzmarker *NPTII* entspricht. In allen weiteren Sublinien wurde das Zielgen nicht nachgewiesen. Da die Hygromycinresistenz zuvor in allen getesteten Linien detektiert wurde, wurde davon ausgegangen, dass das Empfängermaterial auch das zweite Zielgen Potri.019G084600 enthielt.

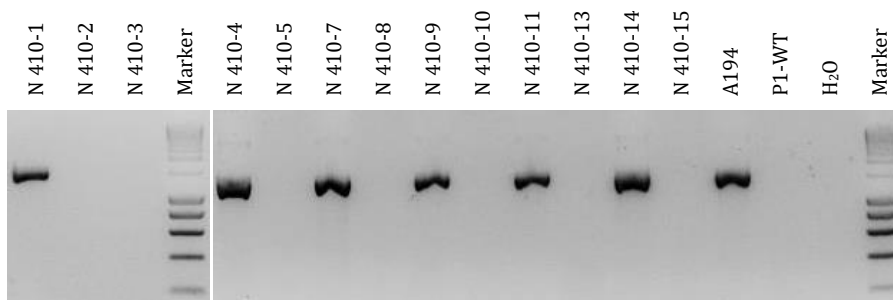


Abb. 3.106: Gelelektrophoretischer Nachweis des Zielgens Potri.007G008600

Die PCR wurde mit den Primern #1448 und #1361 bei einer *Annealing*-Temperatur von 53 °C, mit einer Elongationszeit von 1:40 min und mit 37 Amplifikationszyklen durchgeführt. 5 µL der PCR-Produkte wurden auf einem 1,5% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. Sechs Sublinien enthielten das Zielgen und waren somit doppeltransgen.

Durch die Verwendung des Klons N 327-4 als Ausgangsmaterial für die Transformation enthielten alle Sublinien von N 410 eine Kopie der T-DNA von A201. Per Southern Blot mit der Kanamycinresistenz-Sonde wurden die Kopienzahlen quantifiziert, mit der die T-DNA von A194 in den einzelnen Sublinien von

N 410 vorlag (Abb. 3.107): Die Sublinien N 410-1, -4, -7, -9, -11 und -14 enthielten jeweils eine Kopie der T-DNA. N 410-15 war entsprechend den PCR-Ergebnissen nicht doppeltransgen.

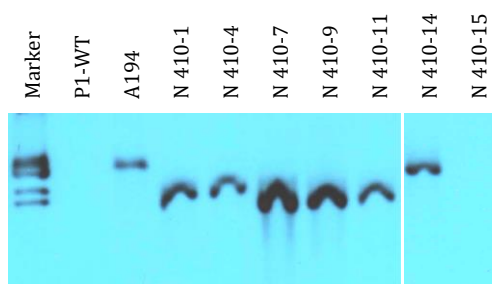


Abb. 3.107: Southern Blot zur Quantifizierung der Kopienanzahl in N 410

Die DNA für dieses Southern Blot wurde mit *EcoRI* restringiert. Die Digoxigenin-markierte Sonde band im Markergen *NPTII* und wurde mit den Primern #317 und #318 synthetisiert. Die Sonde ist 780 bp lang. Als Fragmentlängenmarker wurde der DIG-Marker II (Fa. Roche, Mannheim) verwendet. In sechs Sublinien wurde jeweils eine Kopie der T-DNA von A194 nachgewiesen.

Phänotypisierung

Zur Analyse der Pflanzen unter naturnahen Bedingungen außerhalb der Gewebekultur wurden zahlreiche Pflanzen von ausgewählten Sublinien in zwei Chargen zusammen mit nicht-transgenen Kontrollpflanzen ins Gewächshaus überführt und hier kultiviert. Da die Überführung im Winterhalbjahr vorgenommen wurde, erfuhren die Pappeln keine Unterbrechung ihrer Vegetationsperiode. Nach 46- bzw. 37-wöchiger Kultivierung wurde die Gesamthöhe der Pappeln gemessen. Der Mittelwertvergleich ergab, dass N 410-1 nach 37 Wochen signifikant größer war ($p = 0,03$), allerdings nicht in der Messreihe der für 46 Wochen kultivierten Pappeln. Alle weiteren Sublinien von N 410 hatten keine signifikanten Mittelwertabweichungen (Tab. 3.66, Abb. 3.108).

Tab. 3.66: Zusammenfassung der Höhenmessungen von transgenen Pflanzen der Linie N 410 im Gewächshaus

Transgene Pappeln der Linie N 410 wurden in zwei Chargen ins Gewächshaus überführt. Ihre Gesamthöhen wurden nach 46 bzw. 37 Wochen Kultivierung erhoben. Signifikant größer waren die Pflanzen der Linie N 410-1 nach 37 Wochen Kultivierung ($p = 0,03$).

Linie	Anzahl	Mittelwert [cm]	Median [cm]	Standardabweichung [cm]	p	Signifikanz
46 Wochen Kultur, eine Vegetationsperiode						
Kontrollen	10	227	231	28		
N 410-1	7	250	264	23	0,10	nein
N 410-4	6	203	213	40	0,27	nein
N 410-7	8	232	234	11	0,65	nein
N 410-9	7	223	231	23	0,76	nein
N 410-11	8	222	225	21	0,65	nein
37 Wochen Kultur, eine Vegetationsperiode						
Kontrollen	7	188	225	50		
N 410-1	4	246	252	13	0,03	ja, signifikant größer
N 410-4	4	226	237	23	0,15	nein
N 410-7	9	208	216	29	0,40	nein
N 410-9	7	199	199	23	0,64	nein
N 410-12	5	169	167	17	0,43	nein

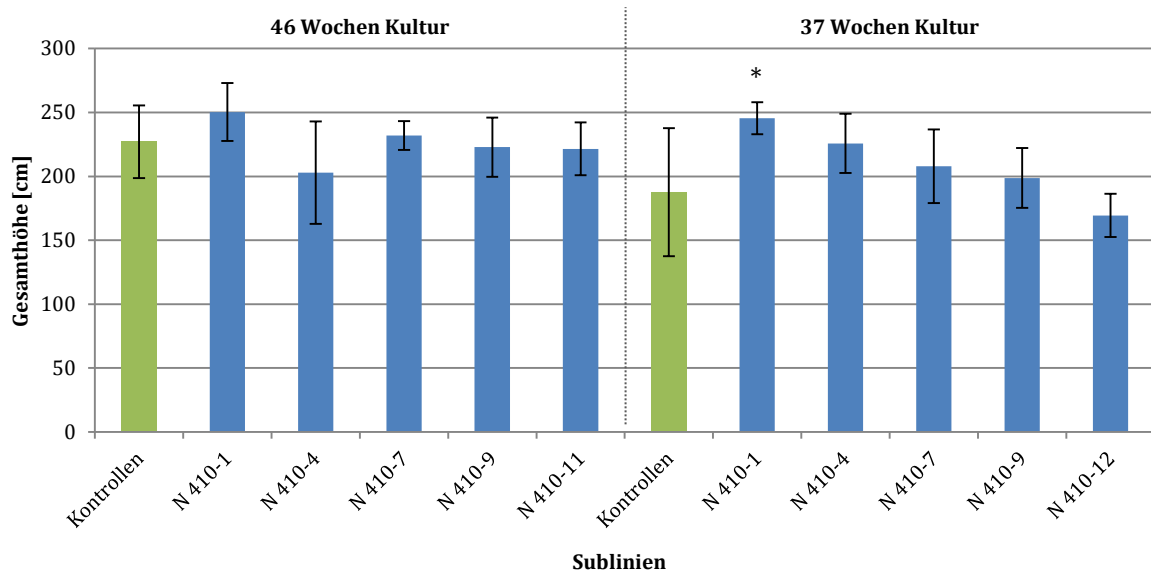


Abb. 3.108: Mittelwertvergleich der Gesamthöhenmessungen von N 410

Die signifikante Mittelwertabweichung von N 410-1 nach 37-wöchiger Kultivierung ist mit * markiert ($p = 0,03$). Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichungen der Mittelwerte an.



Landschaftliche Einordnung einer Pappelplantage in Mitteldeutschland

4 Diskussion

4.1 Zielsetzung

Als schnellwachsende Baumarten sind Pappeln von besonderem Interesse für die Produktion von nachwachsenden Rohstoffen. Das Potential der Pappelklone, die derzeit zur kommerziellen Kultivierung auf Kurzumtriebsplantagen eingesetzt werden, ist in Bezug auf ihre Biomassebildung noch nicht ausgeschöpft. Insbesondere auf Grenzertragsstandorten haben Pappelklone mit optimierter Biomasseproduktion Vorteile.

Zur Optimierung wurden sieben Kandidatengene ausgewählt, von denen die zwei Transkriptionsfaktoren *SOC1* und *FUL* bereits von Melzer *et al.* (2008) in *A. thaliana* modifiziert wurden. Durch den parallelen Knockout der beiden Gene, die in der Blühzeitpunktregulation die Transition von vegetativer zu reproduktiver Meristemidentität induzieren (Demura & Ye 2010), ließ sich in *A. thaliana* das sekundäre Dickenwachstum inklusive Holzbildung initiieren. Fünf weitere Kandidatengene wurden bei Transkriptomanalysen des sich entwickelnden Xylems zweier Pappelklone identifiziert. Per *Agrobacterium*-vermittelter Transformation wurden die Kandidatengene in den Pappelklonen P1 (*P. × canescens*) bzw. Esch5 (*P. tremula* × *P. tremuloides*) überexprimiert und/oder herabreguliert.

Die erzeugten, transgenen Pappeln wurden daraufhin untersucht, ob die Hemmung von *SOC1* und *FUL* in Übereinstimmung zu Melzer *et al.* (2008) zu verstärkter Biomassebildung führte und ob bei Überexpression von *SOC1* und *FUL* eine reduzierte Biomassebildung zu beobachten war. In Bezug auf die fünf weiteren, nur teilweise charakterisierten, Kandidatengene wurde ihr grundsätzlicher Einfluss auf die Biomassebildung in der Pappel untersucht.

4.2 Phänotypenänderungen durch genetische Transformationen von Xylem-exprimierten Kandidatengenen

Aus Transkriptomanalysen, die mit Kambiumgewebe des *P. tremula* × *P. tremuloides*-Klons Esch5 und eines *P. trichocarpa*-Klons durchgeführt wurden (Kersten *et al.*, Thünen-Institut für Forstgenetik, unpubliziert; Lepié *et al.*, INRA Orléans, unpubliziert), wurden fünf Kandidatengene ausgewählt. Unter den Kandidatengenen befanden sich auch drei Transkriptionsfaktoren, die ausgewählt wurden, weil zahlreiche Transkriptionsfaktoren bei der Regulation der Biomasseproduktion beteiligt sind, vor allem die

NAC- und MYB-Transkriptionsfaktoren (Zhong *et al.* 2008, Zhong *et al.* 2011). Darüber hinaus bestand bei der direkten genetischen Veränderungen von Genen der Biomasse-Synthesewege das Risiko von starken pleiotropen Effekten, sodass auf regulative Gene zurückgegriffen wurde.

Die fünf Kandidatengene wurden per *Agrobacterium*-vermittelten Transformationen im *P. × canescens*-Klon P1 modifiziert. Mit diesen Ansätzen sollte die Hypothese überprüft werden, dass die Überexpression oder die Herunterregulierung von Genen, die jeweils in der Blüte und dem sich entwickelndem Xylem oder in den Wurzeln und dem sich entwickelndem Xylem parallel exprimiert wurden, zu Veränderungen in der Biomasse der Pappel führen. Die aus den Transformationen herangezogenen Pappeln hatten ein heterogenes Erscheinungsbild; mehrere Phänotypen mit signifikanten Änderungen wurden identifiziert. Die Modifikationen der fünf Zielgene werden nachfolgend im Einzelnen diskutiert.

4.2.1 Potri.007G008600

Für Potri.007G008600 lagen keine funktionellen Annotierungen in der Datenbank-Sequenz von *P. trichocarpa* vor (<https://phytozome.jgi.doe.gov>, Zugriff am 30.01.2016). Das Gen wurde allerdings stark in den weiblichen und männlichen Kätzchen, sowie dem Xylem exprimiert (<http://bar.utoronto.ca/efppop/cgi-bin/efpWeb.cgi>, Zugriff am 10.02.2016). Durch die BLAST-Analyse der genomischen Sequenz von Potri.007G008600 auf <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Zugriff am 28.06.2016) wurden ein Transkriptionsfaktor-ähnliches Protein in *Theobroma cacao* L. mit 79% Sequenzidentität sowie ein MYB-Transkriptionsfaktor-ähnliches Protein in *P. euphratica* mit 74% Sequenzidentität ermittelt. Diese beiden Funde legten nahe, dass es sich bei Potri.007G008600 um einen Transkriptionsfaktor handeln könnte, möglicherweise sogar einen der MYB-Transkriptionsfaktoren, von denen einige an der Regulation der Biomassebildung beteiligt sind (Zhong *et al.* 2008, Zhong *et al.* 2011). Die genetischen Modifikationen führten nur in wenigen Einzelfällen zu signifikanten Phänotypänderungen, die allerdings nicht einheitlich waren, da größere und kleinere Individuen identifiziert wurden. Dies wurde vor allem nach der zweiten Vegetationsperiode beobachtet, sodass hier wahrscheinlich Kultureffekte maßgebend waren und nicht die genetischen Veränderungen. Die genetische Veränderung von Potri.007G008600 scheint daher nicht für eine angestrebte Biomassesteigerung sinnvoll zu sein.

4.2.2 Potri.002G034400

Während die Überexpression von Potri.002G034400 keine besonderen Phänotypen auslöste, führte die Herunterregulierung dieses Zielgens in mehreren Linien zu veränderten Phänotypen: Hierbei wurden sowohl signifikant größere, als auch signifikant kleinere Pappeln ermittelt. Das Gen Potri.002G034400 wurde zunächst aufgrund der identifizierten DNA-Bindedomäne als Transkriptionsregulator vermutet, allerdings wurde es später in der Datenbanksequenz von *P. trichocarpa* als *PCBER1* annotiert (<https://phytozome.jgi.doe.gov>, Zugriff am 30.01.2016). Dabei handelte es sich um die Phenylcumaranbenzylether-Reduktase (*PCBER*), ein wichtiges Enzym des pflanzlichen Sekundärmetabolismus, das in der Biosynthese von 8-5'-verknüpften Neolignan beteiligt ist (Nuoendagula *et al.* 2016). Lignane sind Phenylpropanoid-abgeleitete Sekundärmetabolite, die in Gefäßpflanzen weit verbreitet (Umezawa 2003) und wahrscheinlich in der Abwehr von biotischen Pathogenen sowie bei der

Wachstumsregulation beteiligt sind (Saguez *et al.* 2013, Nuoendagula *et al.* 2016). *PCBER* wird nach Vander Mijnsbrugge *et al.* (2000 a) vor allem im Xylem und den Wurzeln exprimiert, während die Analyse des Gens im eFP-Browser eine Expression in den Kätzchen und dem Xylem, allerdings nicht in den Wurzeln, darlegte (<http://bar.utoronto.ca/efppop/cgi-bin/efpWeb.cgi>, Zugriff am 10.02.2016). Das Protein ist in allen Zellen des sich entwickelnden Xylems vorhanden, dementsprechend in den Regionen der Lignifizierung (Vander Mijnsbrugge *et al.* 2000 a). Nach Gang *et al.* (1999) ist *PCBER* sogar das häufigste Protein im sekundären Xylem der Pappelart *P. trichocarpa*.

Bei *PCBER* handelt es sich um eine komplexe Enzymgruppe. Durch ihre Vernetzung in verschiedenen Stoffwechselwegen, verschiedene Substrate (Gang *et al.* 1999) und vielfältige Funktionen der Lignane als Reaktionsprodukte sind wahrscheinlich viele regulative Faktoren beteiligt. Allein in *A. thaliana* existieren schon sechs Gene, die in anderen Pflanzenarten beschriebenen *PCBER*-Genen ähneln, wenn auch lediglich eins davon als *AtPCBER1* annotiert wurde. Im Datenbankgenom von *P. trichocarpa* wurden inklusive dem verwendeten Zielgen zehn Homologe gefunden: *PCBER1* (Potri.002G034400), *PCBER2* (Potri.009G118300), *PCBERp2* (Potri.007G123700), *PCBER3* (Potri.009G118100), *PCBERp4* (Potri.001G133300), *PCBER5* (Potri.007G036500), *PCBERp5* (Potri.001G133200), *PCBERp6* (Potri.009G118000), *PCBER7* (Potri.005G228700), *PCBERp8* (Potri.003G100200) (Stichwortsuche „PCBER“, <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!results?search=0&crow=1&star=1&method=3252&searchText=PCBER&offset=0>, Zugriff am 24.05.2016). Nach der in Tuskan *et al.* (2006) dargestellten Genomstruktur weisen die beteiligten Chromosomen 1, 2, 3, 5, 7 und 9 untereinander homologe Sequenzbereiche auf, sodass davon ausgegangen werden kann, dass zum einen die große Anzahl der *PCBER*-Paraloga auf die Genomduplikationen zurückgeht und die Gene von gemeinsamen Vorfahren abstammen. Die genaue Funktion von *PCBER* ist trotz des hohen Vorkommens im Xylem jedoch bislang unklar (Vander Mijnsbrugge *et al.* 2000 b). Während Niculaes *et al.* (2014) annehmen, dass *PCBER* die Pflanze durch die Produktion von Antioxidantien gegen oxidative Schäden schützt, wird auch ein Bezug von *PCBER* zur Holzbildung vermutet (Vander Mijnsbrugge *et al.* 2000 a, Nuoendagula *et al.* 2016). Die beiden pflanzlichen Stoffgruppen Lignan und Lignin haben keine funktionelle Gemeinsamkeit. Ein Zusammenhang besteht dennoch darin, dass ihr Ausgangsedukt Phenylpropanoid-Monomere sind. Denkbar ist, dass die unterschiedlichen Stoffwechselwege, die von Phenylpropanoiden abgeleitet sind, untereinander im regulativen Gleichgewicht stehen. Durch genetische Transformationen zur Überexpression und zum *Knockdown* könnte dies beeinflusst werden, sodass die Systeme in Konkurrenz zueinander geraten könnten.

Die Überexpression des Zielgens Potri.002G034400 könnte demnach zu reduzierter Ligninsynthese führen, da das überexprimierte *PCBER* überproportional Ausgangsedukte verbraucht und sie somit den Enzymen der Ligninsynthese vorenthalten werden könnten. Nach Boerjan *et al.* (2003) führte allerdings der *Knockdown* von *PCBER* zu reduziertem Ligningehalt, wobei die Rolle von *PCBER* in der Holzbildung bislang nicht geklärt ist. Obwohl in der Überexpressionslinie N 282-3 der Ligningehalt durchschnittlich um 0,1% höher war, wurde in dieser untersuchten Linie keine signifikante Abweichung erreicht. Tatsächlich waren die transgenen Linien von N 282, in denen Potri.002G034400 überexprimiert wurde, etwas kleiner, bei N 282-6 nach einer Vegetationsperiode auch signifikant.

Die Transformationslinie N 369 zum *Knockdown* von Potri.002G034400 brachte viele größere Sublinien hervor. Der *Knockdown* von *PCBER* könnte bewirken, dass diese Enzymgruppe weniger Phenylpropanoid-Monomere verbrauchen, wodurch mehr Ausgangssubstrat für die Enzyme des Ligninsynthese-Pathways zur Verfügung steht. Die erzeugte Biomasse wies im Durchschnitt 0,1% weniger (N 369-1) bzw. 0,7% mehr (N 369-4) Lignin als in den Wildtyp-Kontrollen auf, wobei ein signifikantes Niveau nicht erreicht wurde. Zweiteres entspricht den oben geschilderten Beobachtungen von Boerjan *et al.* (2003). Insgesamt sind die Abweichungen in der Wuchshöhe nicht konsistent signifikant. Dennoch könnte *PCBER* als interessantes Kandidatengen für die Beeinflussung der Biomassebildung in der Pappel dienen.

Die Sublinie N 369-10 war deutlich kleiner im Vergleich zu den übrigen Sublinien der Linie N 369, die allesamt größer, größtenteils auch signifikant größer, als die nicht-transgenen Kontrollpflanzen waren. Hier könnte ein Positionseffekt ursächlich gewesen sein. Positionseffekte treten in gentechnisch veränderten Pappeln selten auf, weil einzelne Allelveränderungen in dem diploiden Organismus häufig vom zweiten Allel abgedeckt werden können (Busov *et al.* 2010). Per TAIL-PCR wurde Chromosom 2 als Integrationsort in N 369-10 ermittelt. Hier lag die T-DNA im 5' UTR-Bereich von Potri.002G056500. Es kodierte für ein nicht annotiertes Protein, dessen Funktion aufgrund der identifizierten Domänen wahrscheinlich in der Zellabwehr anzusiedeln ist. Auch homologe Gene in der Pappel oder anderen Arten wie *Salix purpurea* L. oder *Malus × domestica* BORKH. waren nicht annotiert (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!gene?search=1&detail=1&method=3252&searchText=transcriptid:27024584>, Zugriff am 26.05.2016). Potri.002G056500 beinhaltet eine funktionelle NPR1/NIM1-Domäne, die für die systematische Pflanzenabwehr von Relevanz ist. Die Überexpression von einem *NPR1*-Homolog, das diese Domäne trägt, führte in *A. thaliana* zu kleinwüchsigen Pflanzen (Chern *et al.* 2005). Hier wurde dieser Effekt auf eine erhöhte Lichtsensitivität zurückgeführt. Im betroffenen 5' UTR können regulative Elemente liegen, die die Expression des Gens beeinflussen (Graw 2005), z. B. Repressoren. Die Störung dieses Bereichs durch die Integration der T-DNA könnte eine Überexpression von Potri.002G056500 bewirkt haben, woraufhin das Pflanzenwachstum signifikant reduziert war.

4.2.3 Potri.019G084600

Mit Überexpressions- und *Knockdown*-Ansätzen wurde Potri.019G084600 im *P. × canadensis*-Klon P1 genetisch modifiziert. Die aus den Transformationen herangezogenen Pappeln waren insgesamt nicht signifikant abweichend von den nicht-transgenen Pflanzen. Das Gen Potri.019G084600 war mit einer funktionellen NIPA-Domäne von Magnesiumtransportern annotiert (<https://phytozome.jgi.doe.gov>, Zugriff am 30.01.2016). Magnesium ist als Zentralion des Chlorophylls essentiell für die Struktur und Funktion des *Light Harvesting Complex II* in der Photosynthese (Taiz & Zeiger 2000). Auch in der Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/-oxygenase (RubisCO) ist Magnesium Teil des aktiven Zentrums. Zudem dient Magnesium als Co-Substrat vieler ATP-verbrauchender Prozesse (Taiz & Zeiger 2000). Eine Veränderung aller Gene für den Magnesiumtransport würde wahrscheinlich einen massiven Eingriff in den pflanzlichen Stoffwechsel darstellen. Es ist davon auszugehen, dass die Beeinflussung nur eines Magnesiumtransporters nicht zu einem auffälligen Phänotyp mit möglicherweise hellen Blattbereichen führte, wie dies bei Magnesiummangel auftritt (Taiz & Zeiger 2000), da andere Transportsysteme weiterhin aktiv blieben. Zehn Proteine, denen vier unterschiedliche Gene zugrunde liegen, wurden in der

Datenbanksequenz von *P. trichocarpa* identifiziert, die mehr als 60% Sequenzähnlichkeit zu Potri.019G084600 aufwiesen (Abb. 4.1). In allen zehn Genen, die alle auf den Chromosomen 1, 3, 13 oder 19 lokalisiert waren, lag eine annotierte Magnesiumtransporterdomäne vor. Dies ist in sofern interessant, dass die Chromosomen 1 und 3 sowie 13 und 19 nach Tuskan *et al.* (2006) homologe Bereiche aufweisen. Durch die Genomduplikationen der Pappel vermehrte sich daher auch die Zahl dieser Magnesiumtransporter. Die Modifikation dieses Gens scheint nach den erhaltenen Erkenntnissen nicht für die Biomasse-Steigerung in der Pappel sinnvoll einsetzbar zu sein.

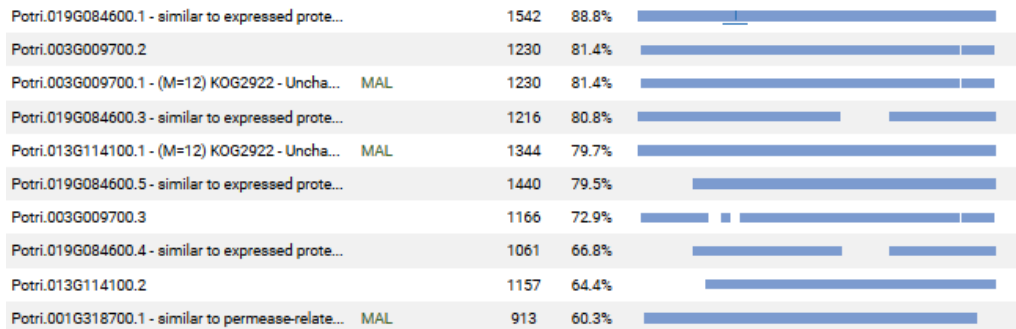


Abb. 4.1: Homologe Proteine von Potri.019G084600

Insgesamt zehn Proteine wurden identifiziert, die der Proteinsequenz von Potri.019G084600 in mehr als 60% übereinstimmten (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!gene?search=1&detail=1&crowd&method=0&searchText=transcriptid:27025654>, Zugriff am 25.05.2016). Alle diese Gene beinhalteten eine funktionelle NIPA-Domäne, die für Magnesiumtransporter charakteristisch ist. Von links nach rechts sind aufgeführt: Genbezeichnung, Score, prozentuale Sequenzidentität und die Verteilung der identischen Bereiche.

4.2.4 Potri.005G123800

Bei Potri.005G123800 handelte es sich um einen GRAS-Transkriptionsfaktor, der als *SCL7* in der Datenbanksequenz von *P. trichocarpa* annotiert wurde (<https://phytozome.jgi.doe.gov>, Zugriff am 30.01.2016). Die in dieser Studie durchgeführten genetischen Veränderungen zur Überexpression von Potri.005G123800 führten nur in einer Linie zu signifikanten Änderungen der Pflanzenhöhe. Sechs überprüfte Pappeln, die im Höhenwachstum nicht signifikant abweichend waren, enthielten allerdings durchschnittlich signifikant mehr Cellulose als die nicht-transgenen Kontrollpflanzen. Andere phänotypische Abweichungen wurden nicht beobachtet. Ein Zusammenhang der Abweichungen zum transformierten Zielgen konnte nicht ausgemacht werden.

Bei Bildung der sekundären Zellwand sind zahlreiche Transkriptionsfaktoren regulativ beteiligt, vor allem NAC- und MYB-Transkriptionsfaktoren (Zhong *et al.* 2008). Während die Synthese der sekundären Zellwand bereits detailliert beschrieben wurde, ist wenig über die transkriptionellen Regulationsmechanismen bekannt (Zhong *et al.* 2008). In Ma *et al.* (2010) wurde beschrieben, wie *SCL7* aus *P. euphratica* (*PeSCL7*) in *A. thaliana* transformiert wurde. *SCL7* wurde darin die Vermittlung von Salz- und Trockenstresstoleranz zugeschrieben, die dann in *A. thaliana* ausgeprägt wurden. *PeSCL7* wurde deswegen als ein mögliches Kandidatengen für Trockenheits- oder Salz-tolerante Bäume vorgeschlagen. Interessant wäre es, die produzierten überexprimierenden Linien von N 329 und N 340 auf Trockenheits- und Salztoleranz zu testen, um den Einfluss der Überexpression von Potri.005G123800 zu prüfen.

4.2.5 Potri.002G223100

Das Gen Potri.002G223100 war in der Datenbank-Sequenz von *P. trichocarpa* völlig unbeschrieben (<https://phytozome.jgi.doe.gov>, Zugriff am 30.01.2016). Es konnten keine homologen Proteine ermittelt werden (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!gene?search=1&detail=1&method=3252&searchText=transcriptid:27020605>, Zugriff am 25.05.16). Ähnlichkeiten von Potri.002G223100 wurden zum Pappelgen Potri.014G162800 und zu den Weidengenen SapurV1A.0014s0790 und SapurV1A.0054s0070 festgestellt (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!showCluster?search=1&detail=0&method=5037&searchText=clusterid:65281398>, Zugriff am 25.05.16). Nach Tuskan *et al.* (2006) liegen auf den Chromosomen 2 und 14 durch die salicoide Genomduplikation homologe Sequenzbereiche vor. Bei den beiden genannten Pappelgenen handelte es sich daher wahrscheinlich um paraloge Gene. Allerdings lagen auch für das Paralog Potri.014G162800 keine funktionellen Annotationen in der Datenbanksequenz vor, ebenfalls nicht für die beiden Orthologe aus der Weide *Salix purpurea* (<https://phytozome.jgi.doe.gov>, Zugriff am 25.05.16). Mit einem *BLAST* der genomischen Sequenzen von Potri.002G223100 auf <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> wurden darüber hinaus keine pappelfremden Sequenzen gefunden. Allerdings wurden drei Pappel-ESTs mit einer Sequenzähnlichkeit zwischen 80 und 98% ermittelt, die aus *opposite wood* von durch Trockenheit stark gestressten Pappeln stammen (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Zugriff am 28.06.2016).

Bei zwei Überexpressionsansätzen im *P. × canescens*-Klon P1 mit diesem Zielgen wurden keine transgenen Pflanzen erhalten. Möglicherweise waren die Pflanzenregenerate bei Überexpression von Potri.002G223100 nicht überlebensfähig. Die mit Potri.002G223100 durchgeführten Doppeltransformationen brachten allerdings transgene Sublinien hervor (siehe Abschnitt 4.2.6 Doppeltransformationen).

Die Ansätze zur Herunterregulierung von Potri.002G223100 spiegelten kein eindeutiges Bild wider. In zwei unabhängigen Sublinien einer Transformation wurden signifikant kleinere Pappeln beobachtet, die zudem einen signifikant erhöhten Proteinanteil hatten. Als Integrationsorte wurden ausschließlich Loci ohne funktionelle Annotierungen ermittelt, sodass ein Positionseffekt unwahrscheinlich war. Aus einer weiteren Transformation entstanden elf Sublinien, von denen jeweils eine signifikant größer und signifikant kleiner war. Die übrigen neun Sublinien waren allerdings unverändert. Durch die fehlende funktionelle Charakterisierung des Zielgens war es schwierig, die Ergebnisse auf die Transformation von Potri.002G223100 zurückzuführen. Möglicherweise handelte es sich eher um Kultureffekte, die in den *Knockdown*-Ansätzen zu einem unterschiedlichen Höhenwachstum der Sublinien führten. Durch das inhomogene Erscheinungsbild ließ sich zudem keine funktionelle Charakterisierung des Gens vornehmen. Die dargestellten Als Kandidatengen für die Pappelzüchtung zur Biomassesteigerung ist das Gen Potri.002G223100 nicht empfehlenswert.

4.2.6 Doppeltransformationen

Die fünf Doppeltransformationen wurden durchgeführt, um Hinweise auf mögliche Kombinationseffekte zu erhalten, wobei aus Kapazitätsgründen nicht alle möglichen Kombinationen getestet werden konnten. Für die Transformationen wurden unterschiedliche Selektionsmarker benötigt, was die Auswahl auf drei Kombinationen eingrenzte. Zusätzlich war die Durchführung zeitlich limitiert, da neben Ansätzen mit zwei

Transformationsvektoren auch Transformationen mit transgenem Spendermaterial durchgeführt werden sollten. Auch musste das Empfängermaterial bereits auf seinen transgenen Status untersucht worden sein. Bis auf eine Linie, die nach der Regeneration nicht in Sprosse, Blätter und Wurzeln differenzierte, sondern als Kallus weiterwuchs, was wahrscheinlich auf transiente Agrobakterien zurückzuführen war, wurden nur zwei Sublinien mit signifikant abweichender Pflanzenhöhe ($p \leq 0,05$) beobachtet. Die Abweichungen traten allerdings nicht innerhalb einer gesamten transgenen Transformationslinie auf, sodass sie möglicherweise auch auf Kultivierungseffekte zurückzuführen sein könnten.

Die Überexpression von Potri.002G034400 und Potri.007G008600 führte zu einer Sublinie mit signifikant kleinerer Pflanzenhöhe ($p = 0,05$), zudem waren die Pappeln eine weitere Sublinie tendenziell kleiner ($p = 0,10$) als die nicht-transgenen Kontrollen. Die übrigen sechs Sublinien entwickelten sich während der Kultivierung im Gewächshaus nicht abweichend von den Kontrollpflanzen. Auch bei den Einzeltransformationen von Potri.002G034400 wurden signifikant kleinere Sublinien beobachtet, während die Einzeltransformanten von Potri.007G008600 bezüglich der Pflanzenhöhe nach Gewächshauskultivierung und der Biomassezusammensetzung keine Abweichungen von den nicht-transgenen Kontrollen zeigten.

Während aus den Einzeltransformationen zur Überexpression von Potri.002G223100 keine transgenen Regenerate herangezogen werden konnten, wurden in der Kombination mit Potri.002G034400 vitale transgene Sublinien erhalten. Die Pappeln zeigten allerdings während der Kultivierung im Gewächshaus keine signifikanten Abweichungen in der Pflanzenhöhe ($p \geq 0,22$).

Die Kombination zur Überexpression von Potri.019G084600 und Potri.007G008600 führte in einer Sublinie zu signifikant größeren Pappeln ($p = 0,03$). Konsistente Phänotypänderungen über alle Sublinien dieser Transformation hinweg wurden allerdings nicht festgestellt, was den Beobachtungen aus den einzeltransgenen Ansätzen entspricht. In den beiden einzelnen Transformationsansätzen wurden keine konsistenten Veränderungen beobachtet.

Insgesamt konnten durch die Doppeltransformationen keine Effekte auf den Phänotyp und das Wuchsverhalten der Pappeln im Gewächshaus festgestellt werden, die die einzeltransgenen Linien nicht zeigten. Keine der durchgeführten Kombinationen eignen sich als Ansätze für die züchterische Optimierung der Pappeln.

4.2.7 Fazit und Einordnung

Die einfache Transformation von Genen, die im Transkriptom von sich entwickelndem Xylem identifiziert wurden, führt nicht zwangsläufig zu Änderungen im Phänotyp oder zu einer Biomassesteigerung. Die Auswahl von Genen, deren Einfluss auf die Biomassebildung naheliegt, beispielsweise bei *PCBER*, ist jedoch vielversprechend. Schwierig gestaltet sich dann allerdings die Konstruktion der Transformationsvektoren zur Herunterregulierung der Zielgene in der Pappel, da in dieser Pflanzengattung, wie zuvor beschrieben, viele Gene in multiplen Kopien vorliegen.

Die Verwendung von Transkriptionsfaktoren scheint dennoch großes Potential zu bergen. Bei der Modifikation von Transkriptionsfaktoren anstelle von katalytischen Genen in den Biomasse-Synthesewegen ist von Vorteil, dass regulative Elemente verändert werden, anstatt diese nachgeschalteten Gene direkt zu modifizieren. Die Modifikation von katalytischen Genen könnte viele

pleiotrope Effekte auslösen. Unter den Kandidatengenomen befanden sich drei Transkriptionsfaktoren, die ausgewählt wurden, weil zahlreiche Transkriptionsfaktoren bei der Regulation der Biomasseproduktion beteiligt sind, vor allem die NAC- und MYB-Transkriptionsfaktoren (Zhong *et al.* 2008, Zhong *et al.* 2011). Besonders intensiv wurden die beiden Gengruppen im Modellorganismus *A. thaliana* erforscht. Als entscheidende Regulatoren bei der Bildung der sekundären Zellwand wurden die beiden *NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING FACTOR*-Gene *NST1* und *NST2* identifiziert. Ihr Knockout führte zum Verlust der sekundären Zellwandverdickung, während ihre Überexpression die sekundäre Zellwandbildung in normalerweise nicht verholzenden Parenchymzellen auslöste und die Expression der in der Biosynthese beteiligten Gene heraufregulierte (Mitsuda *et al.* 2005, Zhong & Ye 2007). Der in *P. trichocarpa* exprimierte NAC-Transkriptionsfaktor *PtrWND2B* wurde von Zhong *et al.* (2011) reprimiert, was zur Reduktion der sekundären Zellwandverdickung führte. Entsprechend den Ergebnissen aus *A. thaliana* löste die Überexpression dieses Pappelgens ebenfalls sekundäre Zellwandbildung in den Parenchymzellen der Blätter aus. Zudem wurden in den transgenen Pappeln die Gene für die Synthese der Holzbestandteile induziert.

Den NAC-Transkriptionsfaktoren sind eine Reihe weiterer regulativer Gene nachgeschaltet, zu denen viele MYB-Transkriptionsfaktoren gehören (McCarthy *et al.* 2010). So werden z. B. die Expression von *PtrMYB3* und *PtrMYB20* in *P. trichocarpa* vom vorgenannten Faktor *PtrWND2* reguliert. Ihre Überexpression aktivierte in Zellen der Blattepidermis von *A. thaliana* die Synthesewege für Cellulose, Xylan und Lignin (McCarthy *et al.* 2010), sodass sie als Transkriptionsaktivatoren anzusehen sind (Zhao & Dixon 2011). In der Pappel selbst wurden Effekte von Legay *et al.* (2010) nachgewiesen: Hier wurde der Transkriptionsfaktor *EgMYB1* aus *Eucalyptus grandis* W.HILL in Pappeln überexprimiert, was u. a. zu reduzierter Verdickung der sekundären Zellwand führte. *EgMYB1* wurde daher als Repressor der sekundären Zellwandbildung identifiziert.

Auch bei den anderen Schritten der Holzbildung, nämlich Zellteilung, Zellvergrößerung und programmiertem Zelltod, sind weitere regulative Mechanismen und Transkriptionsfaktoren beteiligt. Die Aktivität des Sprossapikalmeristems und des vaskulären Kambiums wird beispielsweise von KNOX Homöobox-Genen reguliert (Du & Groover 2010), wobei die Aktivität des vaskulären Kambiums auch durch Phytohormone wie Cytokinine (Demura & Ye 2010) und Auxine reguliert wird (Groover *et al.* 2010). Der Einfluss von Gibberellin wurde in Pappeln nachgewiesen, die die GA20-Oxidase überexprimieren: Durch den erhöhten Gibberellin-Spiegel wurde die Zellvergrößerung gesteigert (Mauriat & Moritz 2009). Der programmierte Zelltod wird wiederum maßgeblich von Transkriptionsfaktoren, darunter Vertreter der bereits erwähnten NAC-Gruppe, ausgelöst (Zhang *et al.* 2011).

Genetisch modifizierte Transkriptionsfaktoren werden auch in transgenen Hybridpappeln (*P. tremula* × *P. tremuloides*, Klon T89) genutzt, die derzeit in einem Freisetzungsvorhaben in Schweden erprobt werden. Die Zielsetzung dieses Freisetzungsvorhabens eines kommerziellen Unternehmens ist die Biomassesteigerung unter Verwendung von acht genetisch modifizierten Transkriptionsfaktoren, die allerdings nicht öffentlich publiziert wurden (http://gmoinfo.jrc.ec.europa.eu/gmp_report.aspx?CurNot=B/SE/15/11847, Zugriff am 29.06.2016).

Bei einem weiteren Feldversuch in Polen mit genetisch veränderten Pappeln (*P. tremula* × *P. tremuloides*, *P. trichocarpa*) und dem Ziel der Veränderung der Biomasseproduktion wurden die verwendeten Gene ebenfalls öffentlich nicht näher definiert (https://gmoinfo.jrc.ec.europa.eu/gmp_report.aspx?CurNot=B/PL/14/02-13, Zugriff am 29.06.2016).

4.3 Genetische Veränderungen von *SOC1* und *FUL*

Die beiden MADS Box-Gene *SOC1* und *FUL* haben nach Melzer *et al.* (2008) einen Einfluss auf die Biomassebildung. Defiziente *soc1/ful*-Mutanten von *A. thaliana* zeigten Eigenschaften perennierender Pflanzen, darunter sekundäres Dickenwachstum mit Holzbildung und Florale Reversion, also die Rückumwandlung reproduktiver Pflanzenteile in vegetatives Gewebe. Für diese Dissertation wurden pappelfremde Orthologe von *SOC1* und *FUL* als Kandidatengene für *Agrobacterium*-vermittelte Transformationen im *P. × canescens*-Klon P1 und dem *P. tremula* × *P. tremuloides*-Hybrid Esch5 verwendet, um Überexpressionsversuche durchzuführen, sowie pappelige Paraloge von *SOC1* und *FUL* für die *Knockdown*-Ansätze.

Durch diese Ansätze sollten die Hypothesen überprüft werden, ob die Überexpression von *SOC1* und *FUL* in Pappeln zu reduzierter Biomassebildung und ob die Herunterregulierung von *SOC1* und *FUL* in Pappeln zu verstärkter Biomassebildung führten.

4.3.1 Herunterregulation

Zur Adaption des *Knockout*-Ansatzes von Melzer *et al.* (2008), bei denen in Doppelmutanten von *A. thaliana* mit defizienten *FUL* und *SOC1* Holzbildung und weitere perennierende Pflanzeigenschaften beobachtet wurden, wurden *Knockdown*-Versuche in der Pappel durchgeführt. Die einzelnen *Knockdowns* durch RNA-Interferenz führten zunächst nicht zu auffälligen Phänotypen. Veränderungen der Biomasseproduktion und der Wachstumsparameter wurden nicht beobachtet. Aufgrund der langen Kultivierungsdauer der Pappeln im Gewächshaus wurde nach drei Jahren die Ausprägung von Blüten an einigen transgenen Pappeln gefunden, in denen *SOC1* herabreguliert war. Da Pappeln in der Regel erstmals nach vier bis 15 Jahren blühen (DiFazio *et al.* 2011), muss dies als frühe Blüte eingestuft werden (siehe unten).

Die Transformationen zum parallelen *Knockdown* von *FUL* und *SOC1* führten zu signifikant kleineren Pflanzen. Eine wie in Melzer *et al.* (2008) beschriebene Steigerung der Biomassebildung konnte auf das perennierende Modellsystem der Pappel nicht übertragen werden. Verändert war allerdings die Zusammensetzung der hölzernen Biomasse. Von den drei Hauptbestandteilen war in drei der vier Sublinien der Cellulose-Anteil signifikant erhöht um bis zu 4,3%.

Die Zielgene in den Transformationsvektoren wurden auf Grundlage der Sequenzen aus *A. thaliana* und *Sinapis alba* (Senf) erstellt. Die Sequenzen stimmten daher nicht vollständig mit den Pappelsequenzen überein. Da die RNA-Interferenz methodisch allerdings so flexibel ist, dass auch Sequenzen mit kleineren Abweichungen erkannt werden sollten, müsste der *Knockdown* funktionieren.

Fraglich ist also, warum die *Knockdowns*, insbesondere der parallele *Knockdown* beider Kandidatengene, keine auffälligen Phänotypen mit gesteigertem Wachstum hervorriefen. Der *Knockdown* war möglicherweise nicht stark genug, um eine Wachstumsabweichung zu produzieren, da einzelne defiziente

Gene einer *Multicopy*-Genfamilie von anderen Angehörigen mit redundanten Funktionen abgepuffert werden können, wie exemplarisch gezeigt von Kempin *et al.* (1995). Gerade MADS Box-Gene, zu denen *FUL* und *SOC1* gehören, sind für ihre vielen Kopien bekannt (Leseberg *et al.* 2006).

In einzelnen Pflanzen in der Gewächshauskultur, bei denen die MADS Box-Gene *SOC1* oder *FUL* per RNA-Interferenz herabreguliert wurden, wurde das Auftreten einer „Frühen Blüte“ beobachtet, also die Ausbildung weiblicher Kätzchen nach bereits drei Jahren.

FUL und *SOC1* wirken induzierend auf die Transition von vegetativem Meristem zu reproduktivem Meristem (Demura & Ye 2010). Das *FUL*-Homolog *BpMADS4* aus *Betula pendula* wurde von Flachowsky *et al.* (2007) in Apfelbäume (*Malus × domestica*) transformiert. Anschließend wurde hier in mehreren Pflanzen von zwei unabhängigen Transformationslinien eine Blütenbildung drei bis vier Monate nach Überführung ins Gewächshaus beobachtet. Die Überexpression von *BpMADS4* und *BpMADS5*, einem weiteren *FUL*-Homolog aus *B. pendula*, führte auch in *Nicotiana tabacum* zu einer extrem frühen Blüte (Elo *et al.* 2001).

Ebenso wurde der positive Einfluss von *SOC1* auf die florale Transition auch in den Versuchen von Melzer *et al.* (2008) bestätigt: Die *soc1*-Mutanten von *A. thaliana* blühten signifikant später; die *ful*-Mutanten leicht verzögert. Die *soc1/ful*-Doppelmutanten zeigten ebenfalls eine, teilweise noch stärker als bei den *soc1*-Mutanten, verzögerte Blütenbildung. Ferner wurde in Mutanten von *A. thaliana* mit defizientem *SOC1* die Suppression von Frühblüh-Phänotypen beobachtet (Araki 2001).

Im Widerspruch dazu stehen die in dieser Dissertation beschriebenen Beobachtungen, dass in einigen Pappeln, in denen *SOC1* und *FUL* durch RNAi-Transformationen beeinflusst wurden, eine frühe Blüte auftrat. Ein ähnlicher Effekt wurde allerdings in transgenen Wald-Erdbeeren (*Fragaria vesca* L.) beobachtet, bei denen durch Herunterregulierung des arteigenen *SOC1*-Orthologs (*FvSOC1*) das kontinuierliche Blühen unter Kurz- und Langtagbedingungen induziert wurde, wobei es unter Langtagbedingungen normalerweise nicht zur Blühinduktion kommt (Mouhu *et al.* 2013). Zudem wurde von Mouhu *et al.* (2013) festgestellt, dass die Blütenbildung in den perennierenden Wald-Erdbeeren trotz induzierenden Kurztagbedingungen unterdrückt war, wenn *FvSOC1* überexprimiert wurde. Die Autoren erklären diesen Effekt durch die induzierende Wirkung von *FvSOC1* auf *TERMINAL FLOWER1* aus *F. vesca* (*FvTFL1*), einem Transkriptionsfaktor, der wiederum die Expression von *AP1* sowie *LFY* hemmt und dadurch die Blütenbildung unterdrückt (Abb. 4.2). Dieser Wirkmechanismus von *SOC1* wurde in der annualen Pflanze *A. thaliana* bisher nicht beschrieben und stellt möglicherweise einen Unterschied zwischen annualen und perennierenden Pflanzen dar. Spekulativ könnte angenommen werden, dass die Herunterregulation eines *SOC1*-Paralogs diesen Effekt auch in der Pappel auslöst, was allerdings bisher nicht näher untersucht wurde. Bezüglich *FUL* liegen derartige Erkenntnisse nicht vor.

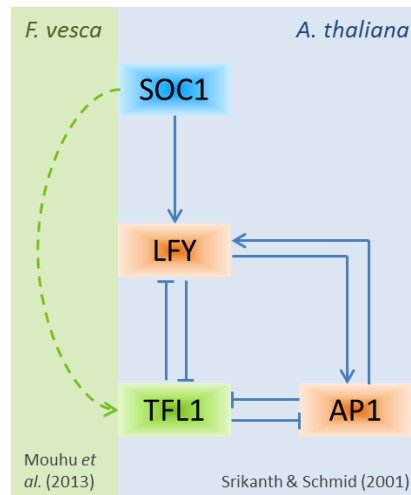


Abb. 4.2: Einfluss von SOC1 auf TERMINAL FLOWER1 (TFL1) in *Fragaria vesca*

Während in *A. thaliana* eine induzierende Wirkung von SOC1 auf LFY bekannt ist und somit die Blütenbildung unterstützt (Srikanth & Schmid 2011), wurde in *F. vesca* beobachtet, dass SOC1 induzierend auf TFL1 wirkt (Mouhu et al. 2013). Somit hat SOC1 in *F. vesca* über TFL1 und AP1 eine die Blütenbildung unterdrückende Funktion.

Möglicherweise kam bei den beobachteten frühblühenden Pappeln noch ein Kultureffekt hinzu: Unter schlechten Standortbedingungen, wie den beengten Pflanztöpfen im Gewächshaus, können Pappeln eine „Notblüte“ initiieren. Eventuell unterstützt dies noch die genetisch bedingte, zuvor beschriebene Blühinduktion. Die Analysen dieser Pflanzen wurde nach Entdeckung der Frühen Blüte auf RNA-Ebene fortgesetzt, sodass die Blütenbildung nach aktuellem Stand nicht abschließend geklärt werden konnte. Darüber hinaus wurden die Blüten bestäubt und von den gebildeten Samen einige Exemplare erfolgreich zur Keimung gebracht (Abb. 4.3). Die Keimlinge wurden in Erde überführt und in einer Klimakammer kultiviert. Die Nachkommen stehen somit ebenfalls für genetische Analysen und Untersuchungen zum Blühzeitpunkt zur Verfügung.

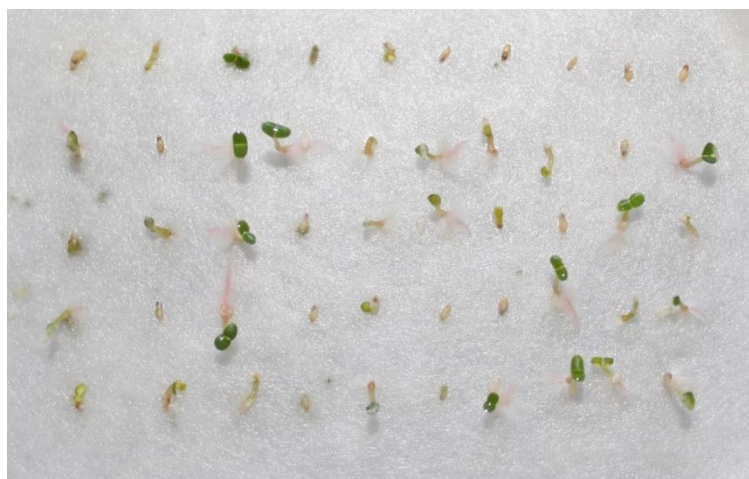


Abb. 4.3: Exemplarische Darstellung von 50 teilweise keimenden Pappelsamen der Kreuzung 12807 × Clone7 (V. Briones, Thünen-Institut für Forstgenetik)

Die Pappel 12807 gehörte zur transgenen Linie N 267-7, die auf Basis des *P. tremula* × *P. tremuloides*-Hybrids Esch5 hergestellt wurde. Clone7 war ein männlicher Klon der Art *P. tremuloides* und stammte ursprünglich aus Michigan, USA. Insgesamt wurden 100 Samen ausgelegt, von denen 46 keimten und sich 26 Pappeln nach zwei Wochen in Erde etablierten.

4.3.2 Überexpression

In den Pappeln wurden Transformationen zur konstitutiven Überexpression von *FUL* aus *S. alba* und *SOC1* aus *A. thaliana* durchgeführt. Nach Anziehen und Kultivierung der transgenen Pappeln im Gewächshaus wurden insgesamt keine oder nur leichte Phänotypabweichungen im Vergleich zu den Wildtypen festgestellt.

Zahlreiche Pappeln, die *SaFUL* überexprimierten, wurden im Gewächshaus herangezogen. Obwohl nach der ersten Vegetationsperiode signifikante Höhenunterschiede beobachtet wurden – fünf transgene Linien waren größer –, konnten die nicht-transgenen Wildtypen im Laufe der zweiten Vegetationsperiode den Vorsprung der transgenen Pappeln aufholen. Dadurch wurden nach der zweiten Vegetationsperiode keine signifikanten Höhenabweichungen mehr beobachtet. Unabhängig vom Transgen wurden in keiner Überexpressionslinie frühblühende Pflanzen beobachtet.

Die Überexpression von *AtSOC1* wurde mit den Linien N 352-1, -4, -5 und -6 sowie N 407-1 umgesetzt. Während der Kultivierung im Gewächshaus entwickelten sich die transgenen Pflanzen vergleichbar mit den nicht-transgenen Kontrollen; signifikante Abweichungen der durchschnittlichen Gesamthöhe lagen nicht vor.

4.3.3 Auffällige, doppeltransgene Phänotypen

Die parallele Überexpression von *SOC1* und *FUL* in den Pappelhybriden zeigte stark auffällige Phänotypen: Die Biomassebildung und der Höhenzuwachs waren signifikant reduziert, zudem waren die Blätter morphologisch verändert und die Wurzelbildung vermindert. In Melzer *et al.* (2008) wurden mit einem Knockout der beiden Gene in *A. thaliana* die sekundäre Zellwand- und Holzbildung erzielt. Abgeleitet daraus wurde angenommen, dass die parallele Überexpression von *SOC1* und *FUL* den gegenteiligen Effekt, nämlich eine Reduktion der Biomasse, erzielen würde. Diese Hypothese wurde bestätigt. Die T-DNA-Integrationsorte wurden per TAIL-PCR in den auffälligen Phänotypen überprüft. Dass Positionseffekte für das Erscheinungsbild verantwortlich waren, ist demnach unwahrscheinlich. Warum und auf welchen molekularen Wegen die Holzbildung von den Transkriptionsfaktoren *SOC1* und *FUL* beeinflusst wird, ist allerdings bislang unklar. Auch in der genannten Veröffentlichung von Melzer *et al.* (2008) wird hierzu keine Hypothese aufgestellt.

4.3.4 Einordnung in den aktuellen Stand der Forschung zu *SOC1* und *FUL*

Nachdem die Arbeitsgruppe um S. Melzer anhand von *Arabidopsis*-Doppelmutanten den Einfluss von *SOC1* und *FUL* auf die Biomassebildung und die Lebensform aufgezeigt hatte, wurde dies auch in einen evolutionären Kontext gestellt: Anscheinend haben Entwicklungsregulatoren einen evolutionären Einfluss auf die ausdauernden Pflanzen (Melzer *et al.* 2008). Theissen *et al.* (2000) legten dar, dass die Duplikation von Genen der Entwicklungskontrolle, zu denen auch die MADS Box-Gene gehören, sehr wahrscheinlich zur Evolution der Pflanzenformen beigetragen haben. Ein möglicher evolutionärer Zusammenhang zwischen der Holzbildung und den MADS Box-Transkriptionsfaktoren *SOC1* und *FUL* fällt in das Gebiet der „EvoDevotics“, der Wortschöpfung aus *Evolution*, *Development* und *Genetics* (Theissen *et al.* 2000). Diese Beziehung zwischen MADS Box-Genen und der Biomassebildung wird über ihre Funktion bei der Determinierung der Meristemidentitäten hergestellt (Demura & Ye 2010). In einer Transkriptomanalyse

von *P. tremula* wurden zahlreiche Gene gefunden, die wahrscheinlich die Kambiumaktivität regulieren. Mehrere davon wiesen Ähnlichkeiten zu Identitätsgenen des Apikalmeristems von *A. thaliana* auf, sodass es sich hierbei möglicherweise um paraloge Gene handelt. Daraus abgeleitet wurde vermutet, dass der Aktivitätsregulierung von apikalem und vaskulärem Meristem ähnliche Programme zu Grunde liegen (Schrader *et al.* 2004, Demura & Ye 2010). Die an der Regulation beteiligten Gene sind daher bezüglich der Biomassesteigerung interessant, da eine verlängerte oder gesteigerte Aktivität vegetativer Meristeme zu mehr Biomasse führt. Dies wurde am Beispiel Tabak und dem MADS Box-Gen *FLOWERING LOCUS C (FLC)* gezeigt (Salehi *et al.* 2005).

SOC1 gehört in die Gruppe der *TM3-like* MADS Box-Gene (Becker & Theißen 2003). Die Rolle von *SOC1* in der Blühzeitpunktregulation ist gut beschrieben: *SOC1* gilt als Blühpromoter und bündelt als Signalintegrator die Induktionen aus gleich vier Signalwegen. Zum einen wird *SOC1* durch *CONSTANS (CO)* induziert, das aus dem Tageslänge-abhängigen Signalweg herrührt. *SOC1* ist zum anderen reprimiert durch *FLC*, einem Transkriptionsfaktor aus dem Vernalisationssignalweg. Neben diesen Regulationsmechanismen, die auf Umweltbedingungen reagieren, gelangen auch die Signale des autonomen (ebenfalls über *FLC*) und des Gibberellin-abhängigen Signalwegs an *SOC1* (Henderson & Dean 2004, Srikanth & Schmid 2011).

Hong *et al.* (2013) überexprimierten das *SOC1*-Homolog *BrAGL20* in *Brassica napus* L. *BrAGL20* stimmt in der Aminosäuresequenz zu 85% mit der Sequenz von *SOC1* aus *A. thaliana* überein. Die Überexpression von *BrAGL20* führte zu einer frühen Blüte. Zuvor wurde bereits von Kim *et al.* (2003) ein Phänotyp mit extrem früher Blüte in *Brassica campestris* L. durch die Überexpression von *AGL20* hervorgerufen.

Neben dem „Blütengen“ *SOC1* sind der *TM3-like* Gruppe der MADS Box-Gene allerdings auch *AGL14* und *AGL19* zugeordnet, die beide ausschließlich in den Wurzeln der Pflanzen exprimiert werden (Becker & Theißen 2003). Insgesamt werden alle *TM3-like* Gene hauptsächlich in vegetativen Geweben exprimiert, sogar wenn sie in der Blühregulation beteiligt sind. Vermutlich liegt ihre ursprüngliche Funktion daher in der vegetativen Entwicklung (Becker & Theißen 2003).

FUL entstammt der kleinen Gruppe der *SQUA-like* Gene (für *SQUAMOSA*). Ehemals wurde *FUL* als *AGL8* bezeichnet, allerdings umbenannt, nachdem der Einfluss dieses Gens auf die Schotenbildung in *A. thaliana* gezeigt wurde (Gu *et al.* 1998). Die *FUL-Knockout*-Mutanten von *Arabidopsis* hatten allerdings keinen besonderen Blüten-spezifischen Phänotyp (Gu *et al.* 1998). Becker & Theißen (2003) vermuten, dass die ursprüngliche Funktion der *SQUA-like* Gene in der Meristemidentität liege. Die Funktion in der Fruchtentwicklung habe sich nachrangig entwickelt (Becker & Theißen 2003), was zeigt, dass MADS Box-Gene in der Lage waren, im Laufe der Evolution neue oder weitere Funktionen zu gewinnen.

Ebenfalls zu dieser Genfamilie gehören *APETALA1 (AP1)* und *CAULIFLOWER (CAL)*, die *FUL* phylogenetisch sehr nahe stehen. Es wird vermutet, dass *FUL* und der gemeinsame Vorgänger von *AP1* und *CAL* durch eine Genduplikation entstanden und so voneinander abstammen (Becker & Theißen 2003, Abb. 4.4). *AP1* und *CAL* sind relativ junge Paraloge und haben redundante Funktionen (Becker & Theißen 2003). Einzelmutanten, in denen *CAL* defizient war, zeigten keinen auffälligen Phänotyp. In

Doppelmutanten, in denen neben *CAL* auch *AP1* defizient war, wurde der auffällige „Cauliflower-Phänotyp“ beobachtet, bei dem die Meristeme extensiv proliferieren (Kempin *et al.* 1995). Dies bestätigt in Hinblick auf den durchgeführten Ansatz, dass paraloge Gene dazu in der Lage sind, den Effekt einer einzelnen *Knockout*-Mutation oder einer einzelnen *Knockdown*-Transformation zu kompensieren, sodass es nicht zu einem auffälligen Phänotyp kommt. Damit ist auch zu begründen, warum in den *Knockdown*-Ansätzen für *SOC1* und *FUL* in der Pappel keine besonderen Phänotypen zu beobachten waren: Paraloge Gene von *SOC1* und *FUL* können die *Knockdowns* kompensiert haben. In Petunien (*Petunia hybrida* E.VILM.) wurden ebenfalls *Knockouts* von MADS Box-Genen der *SQUA*-Gruppe untersucht. Es wurde beobachtet, dass bei diesen Pflanzen die Bildung von Blüten blockiert ist und die Pflanzen im vegetativen Wachstum verharren (Immink *et al.* 1999).

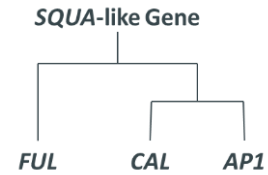


Abb. 4.4: Phylogenetische Beziehung von *FUL* und den eng verwandten paralogenen Genen *CAL* und *AP1*

(nach Becker & Theißen 2003)

Weitere MADS Box-Gene anderer Subfamilien haben aber auch nachweislich Funktionen in vegetativen Pflanzenteilen. Prakash & Kumar (2002) zeigten in transgenen Bäumen der Art *Paulownia kawakamii* T.ITÔ, dass das MADS Box-Gen *PkMADS1* in der Regulation der Sprossmorphogenese eingebunden ist. Dieses Gen wird in die Gruppe der *STMADS11-like* Gene eingeordnet und steht nicht in näherer Abstammungslinie zu den Kandidatengenen *SOC1* oder *FUL* (Becker & Theißen 2003).

4.3.5 Hypothetische Erklärungsmodelle

Aus der Beobachtung der signifikant abweichenden Doppeltransformanten ergab sich eine interessante Frage: Warum kam es zu keiner Biomassesteigerung beim *Knockdown* von *SOC1* und *FUL*, obwohl die Überexpression darlegt, dass *SOC1* und *FUL* auch in der Pappel bei der Biomassebildung beteiligt sind? Zwei Erklärungshypothesen sind denkbar, die im Folgenden dargestellt werden:

Hypothese 1:

Die beiden MADS Box-Gene *SOC1* und *FUL* sind qualitative Regulatoren für die Holzbildung. Sie entscheiden grundsätzlich über das sekundäre Dickenwachstum, vermitteln also „Holzbildung“ (wenn nicht aktiv) oder „keine Holzbildung“ (wenn aktiv/überexprimiert). Sie sind keine quantitativen Regulatoren, die vorgeben, wie viel Holz tatsächlich gebildet wird. Da die Pappel bereits von sich aus Holz produziert und die Holzbildung bereits induziert ist, haben die beiden Gene bei einem *Knockdown* keinen merkbaren Einfluss.

Hypothese 2:

Durch zwei Genomduplikationen in der Evolution der Gattung *Populus* (Tuskan *et al.* 2006) liegen zahlreiche Gene als paraloge Gene vor, d. h. für diese Gene gibt es phylogenetisch verwandte Gene, die teilweise eine ähnliche DNA-Sequenz und eine davon abgeleitete Funktion aufweisen. Bei einem spezifischen *Knockdown* von einzelnen Genen könnten paraloge Gene, die dieselbe Funktion wie das ursprüngliche Zielgen haben, den *Knockdown*-Effekt auffangen. Für *SOC1* liegen in der Pappelart

P. trichocarpa drei Paraloge vor, für *FUL* zwei Paraloge. Sie könnten den *Knockdown*-Effekt abfangen, sodass es nicht zu einer Veränderung der Biomasse kommt.

In der Pappel kam es vor 65 Millionen Jahren zur salicoiden Genomduplikation, die 92% des Genoms betraf. Weite Teile der Chromosomen liegen daher als homologe Regionen vor (Tuskan *et al.* 2006). Bereits zuvor kam es zu einer partiellen Genomduplikation, von der rund 59% des Pappelgenoms beeinflusst sind (Tuskan *et al.* 2006). Einzelne *Loss-of-function*-Mutationen führen daher oftmals nicht zu phänotypischen Änderungen (Busov *et al.* 2010). Tatsächlich wurden in der Pappel drei Paraloge für *SOC1* (Potri.012G133000/*PtSOC1*, Potri.001G112400 und Potri.003G119700) und zwei Paraloge für *FUL* (Potri.008G098500/*PtAGL8.1* und Potri.010G154100/*PtAGL8.2*) identifiziert (Abb. 4.5).

Für Erklärungsmodell 2 sprechen die zuvor bereits geschilderten Erkenntnisse zur Funktion und Evolution der MADS Box-Gene. Beispielhaft sollen hier noch einmal die beiden MADS Box-Gene *API* und *CAL* erwähnt werden, die nah verwandte Paraloge sind und die aufgrund von redundanter Funktion einen *Knockdown* des jeweils anderen Gens abfangen konnten (Kempin *et al.* 1995). Anhand dieses hypothetischen Modells ergeben sich Ansätze zur Weiterentwicklung dieser Studie, die nachfolgend erläutert werden.

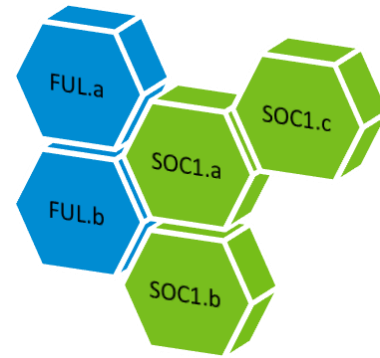


Abb. 4.5: Für *FUL* wurden zwei, für *SOC1* drei paraloge Gene in *P. trichocarpa* identifiziert

Die paralogenen Gene von *FUL* sind auch als *PtAGL8.1* (Potri.008G098500) und *PtAGL8.2* (Potri.010G154100) annotiert. Als *SOC1* ist in *P. trichocarpa* das Gen Potri.012G133000 annotiert, paralog hierzu sind die Gene Potri.001G112400 und Potri.003G119700.

4.4 Perspektive

4.4.1 Weiterentwicklung und Nutzung der Erkenntnisse

Der Bedarf an Pappelklonen, die eine hohe Biomasse-Produktivität aufweisen, besteht unverändert. Zudem ist bei Kurzumtriebsplantagen mit Bäumen eine langfristige Strategie gefragt, da nicht jedes Jahr Einnahmen generiert werden und die Bäume für eine ökonomisch sinnvolle Nutzung länger als einen Umtriebszeitraum kultiviert werden sollten. Beide Punkte unterscheiden sich von der konventionellen Landwirtschaft, sodass die Skepsis gegenüber Kurzumtriebsplantagen weiterhin besteht und die Gesamtfläche an Kurzumtriebsplantagen in den letzten Jahren nicht erhöht wurde (BMELV 2012). Die Vorteile von hölzerner Biomasse als regenerative Energiequelle, die auf Grenzertragsstandorten produziert und sogar gelagert werden kann, bleiben davon dennoch unberührt (Hofmann 1998, Stockmann *et al.* 2010). Durch Bereitstellung geeigneter Kandidatengene könnte der Pappelzüchtung Vorschub geleistet werden.

Vielversprechende Ergebnisse wurden durch die Transformation des *PCBER*-Gens gewonnen. Mehrere der zehn *PCBER*-Paraloge könnten in einem weiterentwickelten Transformationsansatz aufgegriffen werden. Da die Zahl der nutzbaren Selektionsmarker begrenzt ist, sollten dann konservierte Sequenzbereiche ermittelt und als Zielsequenzen für einen *Knockdown*-Ansatz, beispielsweise mit neuen Genome Editing-Techniken wie CRISPR/Cas, verwendet werden.

Zur genetischen Modifikation von *SOC1* und *FUL* musste zu Beginn dieser Studie noch auf zwei annotierte Gene aus *S. alba* und *A. thaliana* zurückgegriffen werden. Mittlerweile sind *SOC1* und *FUL* auch in der Datenbanksequenz von *P. trichocarpa* annotiert. Dadurch kann mit den genauen Sequenzen der Zielgene gearbeitet und zudem können die paralogen Gene identifiziert werden.

Dies eröffnet die Möglichkeit zur Fortentwicklung des durchgeführten Versuchansatzes zur Modifikation der beiden MADS Box-Gene. In Hinblick auf das zweite Erklärungsmodell ist es erstrebenswert, die Zielgene inklusive ihrer identifizierten Paraloge herabzuregulieren. Für *SOC1* liegen in der Pappel drei Paraloge vor, zwei Paraloge für *FUL*. Der *Knockdown* der gesamten Paraloge durch CRISPR/Cas müsste daher einen Effekt zeigen; nach den Erkenntnissen von Melzer *et al.* (2008) hat dies einen positiven Einfluss auf die Holzbildung. Warum und auf welchen Wegen die beiden Transkriptionsfaktoren *SOC1* und *FUL* die Biomassebildung in Pflanzen beeinflussen, konnte bisher nicht geklärt werden. Als Transkriptionsfaktoren haben sie ein Zielgen, dessen Expression sie regulieren. Die Klärung dieses Zusammenhangs ist von Interesse für das Verständnis des Einflusses von MADS Box-Genen auf die Biomassebildung. Bewahrheiten sich die Erwartungen an eine positive Auswirkung auf die Biomassebildung bei parallelem *Knockdown*, wären *SOC1* und *FUL* geeignete Kandidatengene für die Züchtung. Der Einfluss dieser Kombination auf die Blütenbildung wäre dann allerdings ebenfalls zu prüfen.

Die klassische Kreuzungszüchtung mit Baumarten ist allerdings ein langwieriges Unterfangen. Daher kann insbesondere bei langlebigen Bäumen der Einsatz von gentechnischen Methoden und die Produktion transgener Bäume sinnvoll sein (Fladung 2011), wobei sich eine Mehrheit der deutschen Bevölkerung für ein Verbot der Grünen Gentechnik in der Landwirtschaft aussprach (BMUB 2016). Klassische, transgene Pflanzen sind derzeit nur für eine ausländische Nutzung, beispielsweise in Nord- und Südamerika, denkbar. Gentechnisch veränderte Pappeln werden derzeit auch in China angebaut (Fladung 2011). An der mangelnden gesellschaftlichen Akzeptanz von transgenen Pflanzen setzen die Entwicklungen im Bereich der neuen Genome Editing-Techniken an. Nach derzeitigem Stand (Mai 2016) sind lediglich drei Veröffentlichungen erschienen, bei denen CRISPR/Cas in Pappeln angewendet wurde (Fan *et al.* 2015, Tsai & Xue 2015, Zhou *et al.* 2015). Das gesamte Potential dieser Technik in Bäumen kann daher bislang noch nicht abgeschätzt werden. Sollte es zu einer Deregulierung der neuartigen *Genome Editing*-Verfahren kommen, könnten sie genutzt werden, um die zuvor erwähnten Kandidatengene in der Pappel zu nutzen, die langfristig ohne Selektionsmarker auskommen und nicht mehr als im herkömmlichen Sinne gentechnisch verändert erkennbar sind.

4.4.2 Aus den Ergebnissen abgeleitete evolutionäre Fragestellungen

Die Evolution von perennierenden Pflanzen aus annualen Vorgängern trat vielfach unabhängig voneinander auf (Carlquist 1974). Der molekulare Unterschied zwischen perennierenden und annualen Pflanzen scheint daher eher klein zu sein (Melzer *et al.* 2008). Offensichtlich benötigt es für den Wechsel zwischen den Lebensstrategien keine größeren evolutionären Entwicklungen (Thomas *et al.* 2000). Vielmehr scheint der Wechsel in quantitativen Unterschieden in der Genexpression für Zellteilung, Wachstum, Reifung, Seneszenz und Zelltod zu liegen (Thomas *et al.* 2000). Anscheinend ist auch in krautigen, einjährigen Pflanzen wie *Arabidopsis* ein Wachstumsprogramm vorhanden, das

perennierenden Pflanzen ähnelt, also Gene für das sekundäre Dickenwachstum und die Holzbildung. Es scheint so, als seien diese genetischen Programme nicht aktiviert, könnten aber durch vergleichsweise einfache Entwicklungsregulatoren „freigeschaltet“ werden.

Die Ergebnisse dieser Promotionsstudie weisen darauf hin, dass die MADS Box-Gene *SOC1* und *FUL* in der Pappel an der Regulation der Biomassebildung und die damit verbundene Phänotypenausprägung wie Blattmorphologie, Stammdurchmesser und Höhenwachstum beteiligt zu sein scheinen. Eine interessante Fragestellung im evolutionären Kontext wäre, ob *SOC1* und *FUL* ursprünglich „Blütengene“ oder „Biomassegene“, also an der Biomassebildung beteiligte Gene, waren. Dafür müsste geklärt werden, welche der putativen Funktionen sie sekundär erworben haben. Daher wäre auch die Modifikation von MADS Box-Genen in nacktsamigen Pflanzen interessant, die keine Blüten wie bedecktsamige Pflanzen ausbilden. Da MADS Box-Gene hoch konserviert in allen höheren Organismen seit ca. 1 Mrd. Jahren vorkommen, existieren auch in nacktsamigen Pflanzen zahlreiche MADS Box-Gene, die sich für phylogenetische Untersuchungen eignen (Theissen *et al.* 2000, Becker & Theissen 2001). Speziell von der *TM3-like* Unterfamilie, zu der auch das Kandidatengen *SOC1* gehört, sind Vertreter in nacktsamigen Pflanzen vorhanden. Dadurch ist diese Subfamilie der MADS Box-Gene älter als die Trennung von nackt- und bedecktsamigen Pflanzen vor etwa 300 Mio. Jahren (Becker & Theissen 2003). In den nacktsamigen Pflanzen sind diese Gene ebenfalls vor allem in vegetativen Pflanzenteilen exprimiert (Becker & Theissen 2003). Würde durch transgene Ansätze die Funktion dieser *TM3-like* Gene in „blütenlosen“ Pflanzen geklärt und eine mögliche Verbindung zur Biomassebildung aufgezeigt werden, würde dies möglicherweise auch das Verständnis für diese Gene in Blütenpflanzen vervollständigen.



Junge Pappeln bei der Aufzucht

5 Literatur

- Aas G (2006)** *Quercus robur*. In: Schütt P, Weisgerber H, Schuck HJ, Lang U, Stimm B, Roloff A (Herausgeber) Enzyklopädie der Laubbäume. Nicol Verlagsgesellschaft, Hamburg, 485-499.
- An G (1986)** Development of plant promoter expression vectors and their use for analysis of differential activity of nopaline synthase promoter in transformed tobacco cells. *Plant Physiology* 81 (1): 86-91.
- Araki T (2001)** Transition from vegetative to reproductive phase. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 63-68.
- Arvidsson S, Kwasniewski M, Riaño-Pachón DM, Mueller-Roeber B (2008)** QuantPrime - a flexible tool for reliable high-throughput primer design for quantitative PCR. *BMC Bioinformatics* 9: 465.
- Bardwell VJ, Treisman R (1994)** The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif. *Genes & development* 8 (14): 1664-1677.
- Beck E, Ludwig G, Auerswald EA, Reiss B, Schaller H (1982)** Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* 19 (3): 327-336.
- Becker A, Theißen G (2003)** The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Molecular phylogenetics and evolution* 29 (3): 464-489.
- Benfey PN, Chua NH (1990)** The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. *Science* 250 (4983): 959-966.
- Bevan MW, Flavell RB, Chilton MD (1983)** A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* 304: 184-187.
- Blackburn KB, Harrison JWH (1924)** A preliminary account of the chromosomes and chromosome behaviour in the *Salicaceae*. *Annals of Botany* 38 (150): 361-378.
- BLE [Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung] (2012)** Die Pappel. Klone, Klonmischungen und Familieneltern. Bonn.
- BMBF [Bundesministerium für Bildung und Forschung] (2014)** 25 Jahre BMBF-Forschungsprogramme zur biologischen Sicherheitsforschung. Berlin.
- BMEL [Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft] (2015)** Höhere Zuschüsse für Biomasseheizungen. Pressemitteilung 94 vom 26.03.2015, Berlin.
- BMELV [Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz] (2012)** Pappeln und Weiden in Deutschland: Bericht der Nationalen Pappelkommission. Zeitraum 2008-2011. Bonn.
- BMUB [Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit] (2016)** Naturbewusstsein 2015. Bevölkerungsumfrage zu Natur und biologischer Vielfalt. Berlin.
- BMWi [Bundesministerium für Wirtschaft und Energie] (2010)** Energiekonzept für eine umweltschonende, zuverlässige und bezahlbare Energieversorgung. Berlin.
- BMWi [Bundesministerium für Wirtschaft und Energie] (2015)** Erneuerbare Energien im Jahr 2014. Berlin.

- Boerjan W, Polle A, Vander Mijnsbrugge K (2003)** Role in lignification and growth for plant phenylcoumaran benzylic ether reductase. U.S. Patent Application No. 10/531,479, Veröffentlichung US20060015967 A1.
- Bolle C (2004)** The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* 218 (5): 683-692.
- Bonga JM, von Aderkas P (1992)** *In vitro* culture of trees. Kapitel 3: Media preparation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 12-53.
- Borner R, Kampmann G, Chandler J, Gleißner R, Wisman E, Apel K, Melzer S (2000)** A MADS domain gene involved in the transition to flowering in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 24 (5): 591-599.
- Bradshaw HD, Ceulemans R, Davis J, Stettler R (2000)** Emerging model systems in plant biology: poplar (*Populus*) as a model forest tree. *Journal of Plant Growth Regulation* 19 (3): 306-313.
- Braun AC (1947)** Thermal studies on the factors responsible for tumor initiation in crown gall. *American journal of botany* 34 (4): 234-240.
- Brügmann T (2011)** Entwicklung molekularer Marker zur genetischen Charakterisierung von Genotypen verschiedener Arten der Gattung *Populus* L. Masterarbeit, Universität Hamburg.
- Bruegmann T, Fladung M (2013)** Potentials and limitations of the cross-species transfer of nuclear microsatellite marker in six species belonging to three sections of the genus *Populus* L. *Tree Genetics & Genomes* 9 (6): 1413-1421.
- Brunner AM, Nilsson O (2004)** Revisiting tree maturation and floral initiation in the poplar functional genomics era. *New Phytologist* 164: 43-51.
- Bundesanzeiger (2011)** Dreizehntes Gesetz zur Änderung des Atomgesetzes. *Bundesgesetzblatt, Teil I, Nr. 43*: 1704.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009)** The MIQE Guidelines: Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 55 (4): 611-622.
- Busov VB, Strauss SH, Pilate G (2010)** Transformation as a tool for genetic analysis in *Populus*. In: Jansson S, Bhalerao RP, Groover AT (Herausgeber) *Genetics and Genomics of Populus*. Springer, New York, 113-133.
- Caldwell KS, Michelmore RW (2009)** *Arabidopsis thaliana* genes encoding defense signaling and recognition proteins exhibit contrasting evolutionary dynamics. *Genetics* 181 (2): 671-684.
- Carlquist S (1974)** *Island biology*. Columbia University Press, New York & London.
- Cervera M, Storme V, Ivens B, Gusmao J, Liu B, Hostyn V, Van Slycken J, Van Montagu M, Boerjan W (2001)** Dense genetic linkage maps of three *Populus* species (*Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) based on AFLP and microsatellite markers. *Genetics* 158: 787-809.
- Cervera MT, Storme V, Soto A, Ivens B, Van Montagu M, Rajora OP, Boerjan W (2005)** Intraspecific and interspecific genetic and phylogenetic relationships in the genus *Populus* based on AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 111 (7): 1440-1456.
- Chang S, Puryear J, Cairney J (1993)** A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* 11 (2): 113-116.
- Cherian S, Oliveira MM (2005)** Transgenic plants in phytoremediation: recent advances and new possibilities. *Environmental science & technology* 39 (24): 9377-9390.
- Chern M, Fitzgerald HA, Canlas PE, Navarre DA, Ronald PC (2005)** Overexpression of a rice NPR1 homolog leads to constitutive activation of defense response and hypersensitivity to light. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18 (6): 511-520.
- Chilton MD, Drummond MH, Merlo DJ, Sciaky D, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW (1977)** Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 11 (2): 263-271.
- Clark DP, Pazdernik N (2009)** *Molekulare Biotechnologie*. 1. Auflage, Springer-Verlag, Berlin.
- Coleman HD, Canam T, Kang KY, Ellis DD, Mansfield SD (2007)** Over-expression of UDP-glucose pyrophosphorylase in hybrid poplar affects carbon allocation. *Journal of experimental botany* 58 (15-16): 4257-4268.

- Collinson ME (1992)** Vegetational and floristic changes around the Eocene/Oligocene boundary in western and central Europe. *Eocene-Oligocene climatic and biotic evolution* 22: 437-450.
- Curto M, Krajinski F, Küster H, Rubiales D (2014)** Plant defense responses in *Medicago truncatula* unveiled by microarray analysis. *Plant Molecular Biology Reporter* 33 (3): 569-583.
- Dayanandan S, Rajora OP, Bawa KS (1998)** Isolation and characterization of microsatellites in trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Theoretical and Applied Genetics* 96 (6-7): 950-956.
- Demura T, Ye ZH (2010)** Regulation of plant biomass production. *Current Opinion in Plant Biology* 13 (3): 298-303.
- Diepenbrock W (2014)** *Nachwachsende Rohstoffe*. Ulmer Verlag.
- DiFazio SP, Slavov GT, Joshi CP (2011)** *Populus*: A premier pioneer system for plant genomics. In: Joshi CP, DiFazio SP, Kole C (Herausgeber) *Genetics, Genomics and Breeding of Poplar*. Science Publishers, Enfield, 1-28.
- Dohleman FG, Long SP (2009)** More productive than maize in the Midwest: how does *Miscanthus* do it? *Plant Physiology* 150 (4): 2104-2115.
- Doty SL, James CA, Moore AL, Vajzovic A, Singleton GL, Ma C, Khan Z, Xin G, Kang JW, Park JY, Meilan R, Strauss S, Wilkerson J, Farin F, Strand SE (2007)** Enhanced phytoremediation of volatile environmental pollutants with transgenic trees. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104: 16816-16821.
- Douglas CJ, DiFazio SP (2010)** The *Populus* genome and comparative genomics. In: Jansson S, Bhalerao RP, Groover AT (Herausgeber) *Genetics and Genomics of Populus*. Springer, New York, 67-90.
- Du J, Groover A (2010)** Transcriptional regulation of secondary growth and wood formation. *Journal of Integrative Plant Biology* 52 (1): 17-27.
- Du J, Mansfield SD, Groover AT (2009)** The *Populus* homeobox gene *ARBORKNOX2* regulates cell differentiation during secondary growth. *Plant Journal* 60: 1000-1014.
- Dumolin S, Demesure B, Petit RJ (1995)** Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes on pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 1253-1256.
- Eckenwalder JE (1996)** Systematics and evolution of *Populus*. In: Stettler RF, Bradshaw HD, Heilman PE, Hinckley T (Herausgeber) *Biology of Populus and its implications for management and conservation*. NRC Research Press, Ottawa, 7-32.
- Ellis B, Jansson S, Strauss SH, Tuskan GA (2010)** Why and how *Populus* became a "model tree". In: Jansson S, Bhalerao RP, Groover AT (Herausgeber) *Genetics and Genomics of Populus*. Springer, New York, 3-14.
- Elo A, Lemmetyinen J, Turunen ML, Tikka L, Sapanen T (2001)** Three MADS-box genes similar to *APETALA1* and *FRUITFULL* from silver birch (*Betula pendula*). *Physiologia Plantarum* 112 (1): 95-103.
- Eriksson ME, Israelsson M, Olsson O, Moritz T (2000)** Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length. *Nature Biotechnology* 18: 784-788.
- Fan D, Liu T, Li C, Jiao B, Li S, Hou Y, Luo K (2015)** Efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Populus* in the first generation. *Scientific reports* 5.
- Felbermeier B, Mosandl R (2006)** *Fagus sylvatica*. In: Schütt P, Weisgerber H, Schuck HJ, Lang U, Stimm B, Roloff A (Herausgeber) *Enzyklopädie der Laubbäume*. Nicol Verlagsgesellschaft, Hamburg, 241-261.
- Ferrándiz C, Gu Q, Martienssen R, Yanofsky MF (2000)** Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by *FRUITFULL*, *APETALA1* and *CAULIFLOWER*. *Development* 127: 725-734.
- Fillatti JJ, Sellmer J, McCown B, Haissig B, Comai L (1987)** *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of *Populus*. *Molecular and General Genetics* 206: 192-199.
- Flachowsky H, Peil A, Sapanen T, Elo A, Hanke V (2007)** Overexpression of BpMADS4 from silver birch (*Betula pendula* ROTH.) induces early-flowering in apple (*Malus × domestica* BORKH.). *Plant Breeding* 126 (2): 137-145.
- Fladung M (2011)** Gentechnisch veränderte Bäume für eine nachhaltige, umweltverträgliche und ressourcenschonende Produktion von Holz für die Energiegewinnung. *Gesunde Pflanzen* 63: 101-110.
- Fladung M (2013)** Biosprit effizienter und preiswerter herstellen. *Biospektum* 19 (8): 809.
- Fladung M (2015)** *Pflanzenbiotechnologie 3.0*. *Gesunde Pflanzen* 67 (2): 51-58.
- Fladung M, Ahuja MR (1995)** "Sandwich" method for nonradioactive hybridization. *Biotechniques* 18 (5): 800-802.

- Fladung M, Ahuja MR (1996)** Gene transfer in aspen. In: Schmidt ER, Hankeln T (Herausgeber) Transgenic organisms and biosafety. Springer, Berlin/Heidelberg, 275-281.
- Fladung M, Becker D (2010)** Targeted integration and removal of transgenes in hybrid aspen (*Populus tremula* L. × *P. tremuloides* Michx.) using site-specific recombination systems. *Plant Biology* 12 (2): 334-340.
- Fladung M, Hönicka H (2006)** Mit sterilen Pappeln die Auskreuzung in forstliche Ökosysteme verhindern. Forschungsreport 1: 17-20.
- Fladung M, Hoenicka H (2012)** Fifteen years of forest tree biosafety research in Germany. *iForest-Biogeosciences and Forestry* 5 (3): 126.
- Fladung M, Kaldorf M, Buscot F, Muhs HJ (1999)** Untersuchungen zur Stabilität und Expressivität fremder Gene in Aspenklonen (*Populus tremula* und *P. tremula* × *P. tremuloides*) unter Freilandbedingungen. Beiträge zum BMBF-Statusseminar, Braunschweig.
- Fladung M, Kaldorf M, Gieffers W, Ziegenhagen B, Muhs HJ, Kumar S (2004)** Field analysis of transgenic aspen. In: Walter C, Carson M (Herausgeber) *Plantation Forest Biotechnology for the 21st Century*: 393-403.
- Fladung M, Kumar S, Ahuja MR (1997)** Genetic transformation of *Populus* genotypes with different chimaeric gene constructs: transformation efficiency and molecular analysis. *Transgenic Research* 6: 111-121.
- Fladung M, Pasonen HL, Walter C (2010)** Genetically modified trees and associated environmental concerns. *Forests and genetically modified trees*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rom, 177-202.
- Fladung M, Polak O (2012)** *Ac/Ds*-transposon activation tagging in poplar: a powerful tool for gene discovery. *BMC Genomics* 13: 61.
- FNR [Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe] (2005)** Pflanzen für die Industrie. 4. Auflage, Gülzow.
- FNR [Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe] (2012)** Energieholz aus der Landwirtschaft. 5. Auflage, Gülzow.
- FNR [Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe] (2014)** Basisdaten Bioenergie Deutschland 2014. Gülzow.
- FNR [Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe] (2015 a)** Basisdaten Bioenergie Deutschland 2015. Gülzow.
- FNR [Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe] (2015 b)** USB-Platten aus Erle, Weide, Pappel, Birke: Niedrigere VOC-Emissionen als Kiefernholz-Platten. Pressemitteilung 35, Gülzow.
- Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, Adams SP, Bittner ML, Brand LA, Fink CL, Fry JS, Galluppi GR, Goldberg SB, Hoffmann NL, Woo SC (1983)** Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80 (15): 4803-4807.
- Fray RG, Wallace AD, Grierson D (1994)** Identification of unexplained DNA fragments within the T-DNA borders of the Bin 19 plant transformation vector. *Plant molecular biology* 25 (3): 339-342.
- Frisch DA, Harris-Haller LW, Yokubaitis NT, Thomas TL, Hardin SH, Hall TC (1995)** Complete sequence of the binary vector Bin 19. *Plant molecular biology* 27 (2): 405-409.
- Fullner KJ, Lara JC, Nester EW (1996)** Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer genes. *Science* 273 (5278): 1107-1109.
- Gang DR, Kasahara H, Xia ZQ, Vander Mijnsbrugge K, Bauw G, Boerjan W, Van Montagu M, Davin LB, Lewis NG (1999)** Evolution of plant defense mechanisms. Relationships of phenylcoumaran benzylic ether reductases to pinosresinol-lariciresinol and isoflavone reductases. *Journal of Biological Chemistry* 274 (11): 7516-7527.
- Gaudet M, Jorge V, Paolucci I, Beritognolo I, Scarascia Mugnozza G, Sabatti M (2007)** Genetic linkage maps of *Populus nigra* L. including AFLPs, SSRs, SNPs, and sex trait. *Tree Genetics & Genomes* 4: 25-36.
- Gilbert N (2013)** A hard look at GM crops. *Nature* 497 (7447): 24-26.
- Goodner B, Hinkle G, Gattung S, Miller N, Blanchard M, Qurollo B, Goldman B, Cao Y, Askenazi M, Halling C, Mullin L, Houmiel K, Gordon J, Vaudin M, Iartchouk O, Epp A, Liu F, Wollam C, Allinger M, Doughty D, Scott C, Lappas C, Markelz B, Flanagan C, Crowell C, Gurson J, Lomo C, Sear C, Strub G, Cielo C, Slater S (2001)** Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294 (5550): 2323-2328.
- Graw J (2005)** Genetik. 4. Auflage, Springer-Verlag, Berlin.

- Gritz L, Davies J (1983)** Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 25 (2): 179-188.
- Groover AT, Nieminen K, Helariutta Y, Mansfield SD (2010)** Wood formation in *Populus*. In Jansson S, Bhalerao R, Groover AT (Herausgeber) *Genetics and Genomics of Populus*. Springer-Verlag, New York, 201-224.
- Grünwald C, Ruel K, Joseleau JP, Fladung M (2001)** Morphology, wood structure and cell wall composition of rolC transgenic and non-transformed aspen trees. *Trees* 15 (8): 503-517.
- Gu Q, Ferrándiz C, Yanofsky MF, Martienssen R (1998)** The FRUITFULL MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. *Development* 125 (8): 1509-1517.
- Häggman H, Sutela S, Walter C, Fladung M (2014)** Biosafety Considerations in the Context of Deployment of GE Trees. In: Fenning T (Herausgeber) *Challenges and Opportunities for the World's Forests in the 21st Century*. Springer, Dordrecht, 491-524.
- Hanks SK, Quinn AM, Hunter T (1988)** The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241 (4861): 42-52.
- Heldt HW, Piechulla B (2008)** Pflanzenbiochemie. 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Hellens R, Mullineaux P, Klee H (2000)** Technical focus: a guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in plant science* 5 (10): 446-451.
- Henderson IR, Dean C (2004)** Control of *Arabidopsis* flowering: the chill before the bloom. *Development* 131 (16): 3829-3838.
- Herrera-Estrella L, Depicker A, Van Montagu M, Schell J (1983)** Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 303: 209-213.
- Hoenicke H, Lautner S, Klingberg A, Koch G, El-Sherif F, Lehnhardt D, Zhang B, Burgert I, Odermatt J, Melzer S, Fromm J, Fladung M (2012)** Influence of over-expression of the FLOWERING PROMOTING FACTOR 1 gene (FPF1) from *Arabidopsis* on wood formation in hybrid poplar (*Populus tremula* L. × *P. tremuloides* MICHX.). *Planta* 235 (2): 359-373.
- Hoenicke H, Nowitzki O, Hanelt D, Fladung M (2008)** Heterologous overexpression of the birch *FRUITFULL*-like MADS-box gene *BpMADS4* prevents normal senescence and winter dormancy in *Populus tremula* L. *Planta* 227 (5): 1001-1011.
- Hofmann M (1998)** Bewirtschaftung schnellwachsender Baumarten auf landwirtschaftlichen Flächen im Kurzumtrieb. Merkblatt 11. Forschungsinstitut für schnellwachsende Baumarten, Hann. Münden.
- Hofmann M (2002)** Anbau von Pappeln auf landwirtschaftlichen Stilllegungsflächen zur Erzeugung von Holzstoff für die Papierherstellung. Merkblatt 12. Forschungsinstitut für schnellwachsende Baumarten, Hann. Münden.
- Hong JK, Kim SY, Kim KS, Kwon SJ, Kim JS, Kim JA, Lee SI, Lee YH (2013)** Overexpression of a *Brassica rapa* MADS-box gene, BrAGL20, induces early flowering time phenotypes in *Brassica napus*. *Plant biotechnology reports* 7 (3): 231-237.
- Hood EE, Gelvin SB, Melchers LS, Hoekema A (1993)** New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic research* 2 (4): 208-218.
- Howe GT, Strauss SH, Goldfarb B (1991)** Insertion of the maize transposable element Ac into poplar. In: Ahuja MR (Herausgeber) *Woody Plant Biotechnology*. Springer, New York, 283-294.
- Huetteman CA, Preece JE (1993)** Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33 (2): 105-119.
- Hu JJ, Tian YC, Han YF, Li L, Zhang BE (2001)** Field evaluation of insect-resistant transgenic *Populus nigra* trees. *Euphytica* 121 (2): 123-127.
- Immink RG, Hannapel DJ, Ferrario S, Busscher M, Franken J, Campagne ML, Angenent GC (1999)** A petunia MADS box gene involved in the transition from vegetative to reproductive development. *Development* 126 (22): 5117-5126.
- IPC [International Poplar Commission] (2004)** Report: 22nd session of the International Poplar Commission and 42nd session of its Executive Committee. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rom.

- James C (2015)** 20th Anniversary (1996-2015) of the Global Commercialization of Biotech Crops and Biotech Crop Highlights in 2015. ISAAA Brief 51-2015, Manila, Philippinen.
- Jansson S, Bhalerao RP, Groover AT (2010)** Preface. In: Jansson S, Bhalerao RP, Groover AT (Herausgeber) Genetics and Genomics of *Populus*. Springer, New York, V-VII.
- Jansson S, Douglas CJ (2007)** *Populus*: a model system for plant biology. Annual Review of Plant Biology 58: 435-458.
- Jany KD, Kellmann JW (2015)** Züchtung 3.0 - Moderne Züchtungstechniken für die Nutzpflanzen der Zukunft. Food-Lab 3: 4-6.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012)** A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 337 (6096): 816-821.
- Jouanin L, Brasileiro ACM, Leplé JC, Pilate G, Cornu D (1993)** Genetic transformation: a short review of methods and their applications, results and perspectives for forest trees. Annales des sciences forestières 50 (4): 325-336.
- Jouanin L, Goujon T, de Nadaï V, Martin MT, Mila I, Vallet C, Pollet B, Yoshinaga A, Chabbert B, Petit-Conil M, Lapierre C (2000)** Lignification in transgenic poplars with extremely reduced caffeic acid *O*-methyltransferase activity. Plant Physiology 123 (4): 1363-1374.
- Kaltschmitt M, Hartmann H, Hofbauer H (2009)** Energie aus Biomasse. Grundlagen, Techniken und Verfahren. 2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin.
- Kauter D, Lewandowski I, Claupein W (2001)** Pappeln in Kurzumtriebswirtschaft: Eigenschaften und Qualitätsmanagement bei der Festbrennstoffbereitstellung - Ein Überblick. Pflanzenbauwissenschaften 5 (2): 64-74.
- Kempin SA, Savidge B, Yanofsky MF (1995)** Molecular basis of the cauliflower phenotype in *Arabidopsis*. Science 267: 522-525.
- Kim KW, Shin JH, Moon J, Kim M, Lee J, Park MC, Lee I (2003)** The function of the flowering time gene *AGL20* is conserved in Crucifers. Molecules and cells 16 (1): 136-141.
- Klemm D, Heublein B, Fink HP, Bohn A (2005)** Cellulose: faszinierendes Biopolymer und nachhaltiger Rohstoff. Angewandte Chemie 117: 3422-3458.
- Koch G (2004)** Topochemical characterization of lignins and phenolic extractives in wood cell walls. Lenzinger Berichte 83: 6-12.
- Krens FA, Schaart JG, van der Burgh AM, Tinnenbroek-Capel IEM, Groenwold R, Kodde LP, Broggin GAL, Geeler C, Schouten HJ (2015)** Cisgenic apple trees; development, characterization, and performance. Frontiers in Plant Science 6: 286.
- Kumar S, Fladung M (2000)** Transgene repeats in aspen: molecular characterisation suggests simultaneous integration of independent T-DNAs into receptive hotspots in the host genome. Molecular and General Genetics 264 (1-2): 20-28.
- Lee J, Lee I (2010)** Regulation and function of SOC1, a flowering pathway integrator. Journal of Experimental Botany 61 (9): 2247-2254.
- Legay S, Sivadon P, Blervacq AS, Pavy N, Baghdady A, Tremblay L, Levasseur C, Ladouce N, Lapierre C, Séguin A, Hawkins S, Mackay J, Grima-Pettenati J (2010)** *EgMYB1*, an R2R3 MYB transcription factor from eucalyptus negatively regulates secondary cell wall formation in *Arabidopsis* and poplar. New Phytologist 188 (3): 774-786.
- Leple JC, Brasileiro ACM, Michel MF, Delmotte F, Jouanin L (1992)** Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs. Plant Cell Reports 11 (3): 137-141.
- Leplé JC, Dauwe R, Morreel K, Storme V, Lapierre C, Pollet B, Naumann A, Kang KY, Kim H, Ruel K, Lefèbvre A, Joseleau JP, Grima-Pettenati J, De Rycke R, Andersson-Gunnerås S, Erban A, Fehrle I, Petit-Conil M, Kopka J, Polle A, Messens E, Sundberg B, Mansfield SD, Ralph J, Pilate G, Boerjan W (2007)** Downregulation of cinnamoyl-coenzyme A reductase in poplar: multiple-level phenotyping reveals effects on cell wall polymer metabolism and structure. The Plant Cell 19 (11): 3669-3691.
- Leseberg CH, Li A, Kang H, Duvall M, Mao L (2006)** Genome-wide analysis of the MADS-box gene family in *Populus trichocarpa*. Gene 378: 84-94.
- Licht LA, Isebrands JG (2005)** Linking phytoremediated pollutant removal to biomass economic opportunities. Biomass and Bioenergy 28: 203-218.

- Li L, Zhou Y, Cheng X, Sun J, Marita JM, Ralph J, Chiang VL (2003)** Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene cotransformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (8): 4939-4944.
- Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier RF (1995)** Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *The Plant Journal* 8 (3): 457-463.
- Lloyd G, McCown B (1980)** Commercially-feasible micro-propagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proceedings of the International Plant Propagator's Society* 30: 421-426
- Lu CY (1993)** The use of thidiazuron in tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 29 (2): 92-96.
- Lührs R, Efremova N, Welters P, Teichmann T, Fladung M, Hennig A, Meier-Dinkel A, Janssen A (2015)** Entwicklung polyploider Pappelinien von verschiedenen Arten mit Hilfe der Protoplastenfusion. In: Liesebach M (Herausgeber): *FastWOOD II: Züchtung schnellwachsender Baumarten für die Produktion nachwachsender Rohstoffe im Kurzumtrieb – Erkenntnisse aus 6 Jahren FastWOOD*. Thünen-Report 26, 185-191.
- Lu S, Li L, Zhou G (2010)** Genetic modification of wood quality for second-generation biofuel production. *GM Crops* 1 (4): 230-236.
- Ma HS, Liang D, Shuai P, Xia XL, Yin WL (2010)** The salt- and drought-inducible poplar GRAS protein SCL7 confers salt and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany* 61 (14): 4011-4019.
- Malinovsky FG, Brodersen P, Fiil BK, McKinney LV, Thorgrimsen S, Beck M, Nielsen HB, Pietra S, Zipfel C, Robatzek S, Petersen M, Hofius D, Mundy J (2010)** Lazarus1, a DUF300 protein, contributes to programmed cell death associated with *Arabidopsis acd11* and the hypersensitive response. *PloS one*, 5 (9): e12586.
- Mann S (1998)** *Nachwachsende Rohstoffe*. Ulmer Verlag, Stuttgart.
- Mansfield SD, Weineisen H (2007)** Wood fiber quality and kraft pulping efficiencies of trembling aspen (*Populus tremuloides* MICHX) clones. *Journal of wood chemistry and technology* 27 (3-4): 135-151.
- Mao F, Leung WY, Xin X (2007)** Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. *BMC biotechnology* 7 (1): 76.
- Mauriat M, Moritz T (2009)** Analyses of GA20ox-and GID1-over-expressing aspen suggest that gibberellins play two distinct roles in wood formation. *The Plant Journal* 58 (6): 989-1003.
- McCarthy RL, Zhong R, Fowler S, Lyskowski D, Piyasena H, Carleton K, Spicer C, Ye ZH (2010)** The poplar MYB transcription factors, PtrMYB3 and PtrMYB20, are involved in the regulation of secondary wall biosynthesis. *Plant and Cell Physiology* 51 (6): 1084-1090.
- Mellerowicz EJ, Baucher M, Sundberg B, Boerjan W (2001)** Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem. *Plant Molecular Biology* 47: 239-274.
- Melzer S, Lens F, Gennen J, Vanneste S, Rohde A, Beeckman T (2008)** Flowering-time genes modulate meristem determinacy and growth form in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* 40: 1489-1492.
- Michal G (1999)** *Biochemical pathways*. Biochemie-Atlas. 1. Ausgabe, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Mitsuda N, Seki M, Shinozaki K, Ohme-Takagi M (2005)** The NAC transcription factors NST1 and NST2 of *Arabidopsis* regulate secondary wall thickenings and are required for anther dehiscence. *The Plant Cell* 17 (11): 2993-3006.
- Mouhu K, Kurokura T, Koskela EA, Albert VA, Elomaa P, Hytönen T (2013)** The *Fragaria vesca* homolog of SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 represses flowering and promotes vegetative growth. *The Plant Cell* 25 (9): 3296-3310.
- Neer EJ, Schmidt CJ, Nambudripad R, Smith TF (1994)** The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* 371 (6495): 297-300.
- Niculaes C, Morreel K, Kim H, Lu F, McKee LS, Ivens B, Haustraete J, Vanholme B, De Rycke R, Hertzberg M, Fromm J, Bulone V, Polle A, Ralph J, Boerjan W (2014)** Phenylcoumaran benzylic ether reductase prevents accumulation of compounds formed under oxidative conditions in poplar xylem. *The Plant Cell* 26 (9): 3775-3791.
- Nieminen K, Immanen J, Laxell M, Kauppinen L, Tarkowski P, Dolezal K, Tähtiharju S, Elo A, Decourteix M, Ljung K, Bhalerao R, Keinonen K, Albert VA, Helariutta Y (2008)** Cytokinin signaling regulates cambial development in poplar. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 105: 20032-20037.

- Nieminen K, Robischon M, Immanen J, Helariutta Y (2012)** Towards optimizing wood development in bioenergy trees. *New Phytologist* 194 (1): 46-53.
- Nuoendagula, Kamimura N, Mori T, Nakabayashi R, Tsuji Y, Hishiyama S, Saito K, Masai E, Kajita S (2016)** Expression and functional analyses of a putative phenylcoumaran benzylic ether reductase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant cell reports* 35: 513-526.
- Pakull B, Groppe K, Mecucci F, Gaudet M, Sabatti M, Fladung M (2011)** Genetic mapping of linkage group XIX and identification of sex-linked SSR markers in a *Populus tremula* × *Populus tremuloides* cross. *Canadian Journal of Forest Research* 41 (2): 245-253.
- Pakull B, Groppe K, Meyer M, Markussen T, Fladung M (2009)** Genetic linkage mapping in aspen (*Populus tremula* L. and *Populus tremuloides* MICHX.). *Tree Genetics & Genomes* 5: 505-515.
- Park YW, Baba KI, Furuta Y, Iida I, Sameshima K, Arai M, Hayashi T (2004)** Enhancement of growth and cellulose accumulation by overexpression of xyloglucanase in poplar. *FEBS letters* 564 (1) 183-187.
- Parsons TJ, Sinkar VP, Stettler RF, Nester EW, Gordon MP (1986)** Transformation of Poplar by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology* 4 (6): 533-536.
- Pettengill EA, Parmentier-Line C, Coleman GD (2012)** Evaluation of qPCR reference genes in two genotypes of *Populus* for use in photoperiod and low-temperature studies. *BMC Research Notes* 5 (1): 366.
- Peuke AD, Rennenberg H (2006)** Heavy metal resistance and phytoremediation with transgenic trees. In: Fladung M, Ewald D (Herausgeber) *Tree Transgenesis*. Springer, Berlin, 137-155.
- Prakash AP, Kumar PP (2002)** *PkMADS1* is a novel MADS box gene regulating adventitious shoot induction and vegetative shoot development in *Paulownia kawakamii*. *The Plant Journal* 29 (2): 141-151.
- Purves WK, Sadava D, Orians GH, Heller HC (2006)** *Biologie*. 7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Putterill J, Laurie R, Macknight R (2004)** It's time to flower: the genetic control of flowering time. *Bioessays* 26 (4): 363-373.
- Pysh LD, Wysocka-Diller JW, Camilleri C, Bouchez D, Benfey PN (1999)** The GRAS gene family in Arabidopsis: Sequence characterization and basic expression analysis of the *SCARECROW-LIKE* genes. *The Plant Journal* 18 (1): 111-119.
- Rajora OP, Dancik BP (1992)** Genetic characterization and relationships of *Populus alba*, *P. tremula*, and *P. × canescens*, and their clones. *Theoretical and Applied Genetics* 84 (3-4): 291-298.
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE (2000)** *Biologie der Pflanzen*. 4. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin.
- Robledo-Arnuncio JJ, González-Martínez SC, Smouse PE (2010)** Theoretical and practical considerations of gene flow. *Forests and genetically modified trees*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rom, 147-162.
- Roloff A, Pietzarka U (2006)** *Betula pendula*. In: Schütt P, Weisgerber H, Schuck HJ, Lang U, Stimm B, Roloff A (Herausgeber) *Enzyklopädie der Laubbäume*. Nicol Verlagsgesellschaft, Hamburg, 125-141.
- Saguez J, Attoumbré J, Giordanengo P, Baltora-Rosset S (2013)** Biological activities of lignans and neolignans on the aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Arthropod-Plant Interactions* 7 (2): 225-233.
- Saha BD (2003)** Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30 (5): 279-291.
- Salehi H, Ransom CB, Oraby HF, Seddighi Z, Sticklen MB (2005)** Delay in flowering and increase in biomass of transgenic tobacco expressing the *Arabidopsis* floral repressor gene FLOWERING LOCUS C. *Journal of Plant Physiology* 162: 711-717.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989)** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. Auflage, Band 3, Appendix E6, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sanford JC, Klein TM, Wolf ED, Allen N (1987)** Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Particulate Science and Technology* 5 (1): 27-37.
- Sato K, Ueda T, Nakano A (1999)** The *Arabidopsis thaliana* *RER1* gene family: its potential role in the endoplasmic reticulum localization of membrane proteins. *Plant molecular biology* 41 (6): 815-824.
- Scheller HV, Ulvskov P (2010)** Hemicelluloses. *Plant Biology* 61 (1): 263-289.

- Schilperoort RA, Veldstra H, Warnaar SO, Mulder G, Cohen JA (1967)** Formation of complexes between DNA isolated from tobacco crown gall tumours and RNA complementary to *Agrobacterium tumefaciens* DNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis* 145 (2): 523-525.
- Schopfer P, Brennicke A (2010)** Pflanzenphysiologie. 7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Schrader J, Nilsson J, Mellerowicz E, Berglund A, Nilsson P, Hertzberg M, Sandberg G (2004)** A high-resolution transcript profile across the wood-forming meristem of poplar identifies potential regulators of cambial stem cell identity. *The Plant Cell* 16 (9): 2278-2292.
- Schroeder H, Hoeltken AM, Fladung M (2012)** Differentiation of *Populus* species using chloroplast single nucleotide polymorphism (SNP) markers - essential for comprehensible and reliable poplar breeding. *Plant biology* 14 (2): 374-381.
- Schütt P, Weisgerber H, Schuck HJ, Lang UM, Stimm B, Roloff A (2006)** Enzyklopädie der Laubbäume: Die große Enzyklopädie. Nicol Verlagsgesellschaft, Hamburg.
- Sharon N, Lis H (1990)** Legume lectins--a large family of homologous proteins. *The FASEB Journal* 4 (14): 3198-3208.
- Shim D, Kim S, Choi YI, Song WY, Park J, Youk ES, Jeong SC, Martinoia E, Noh EW, Lee Y (2013)** Transgenic poplar trees expressing yeast cadmium factor 1 exhibit the characteristics necessary for the phytoremediation of mine tailing soil. *Chemosphere* 90 (4): 1478-1486.
- Slavov GT, Zhelev P (2010)** Salient biological features, systematics, and genetic variation of *Populus*. In: Jansson S, Bhalerao RP, Groover AT (Herausgeber) *Genetics and Genomics of Populus*. Springer-Verlag, New York: 15-38.
- Smith EF, Townsend CO (1907)** A plant-tumor of bacterial origin. *Science*: 671-673.
- Song WY, Sohn EJ, Martinoia E, Lee YJ, Yang YY, Jasinski M, Forestier C, Hwang I, Lee Y (2003)** Engineering tolerance and accumulation of lead and cadmium in transgenic plants. *Nature biotechnology* 21 (8): 914-919.
- Southern EM (1975)** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of molecular biology* 98 (3): 503-517.
- Srikanth A, Schmid M (2011)** Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68 (12): 2013-2037.
- Stockmann F, Hagemann H, Wenzelides M (2010)** Holzartige Biomasse in der Landwirtschaft - Praxisratgeber Teil 1. *Acker plus* 4: 30-35.
- Stohl A, Seibert P, Wotawa G, Arnold D, Burkhart JF, Eckhardt S, Tapia C, Vargas A, Yasunari TJ (2012)** Xenon-133 and caesium-137 releases into the atmosphere from the Fukushima Dai-ichi nuclear power plant: determination of the source term, atmospheric dispersion, and deposition. *Atmospheric Chemistry and Physics* 12: 2313-2343.
- Street NR, Tsai CJ (2010)** *Populus* Resources and Bioinformatics. In: Jansson S, Bhalerao RP, Groover AT (Herausgeber) *Genetics and Genomics of Populus*. Springer-Verlag, New York: 135-152.
- Stryer L (1995)** Biochemie. 4. Auflage, korr. Nachdruck 1999, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. Kapitel 25.
- Sun CW, Callis J (1997)** Independent modulation of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin mRNAs in different organs and in response to environmental changes. *The Plant Journal* 11 (5): 1017-1027.
- Szuba A (2015)** Ectomycorrhiza of *Populus*. *Forest Ecology and Management* 347: 156-169.
- Taiz L, Zeiger E (2000)** Physiologie der Pflanzen. 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Theissen G, Becker A, Di Rosa A, Kanno A, Kim JT, Münster T, Winter KU, Saedler H (2000)** A short history of MADS-box genes in plants. In: Doyle JJ, Gaut BS (Herausgeber) *Plant Molecular Evolution*. Springer-Verlag, Netherlands: 115-149.
- Thomashow MF, Nutter R, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW (1980)** Integration and organization of Ti plasmid sequences in crown gall tumors. *Cell* 19 (3): 729-739.
- Thomas H, Thomas HM, Ougham H (2000)** Annuality, perenniality and cell death. *Journal of Experimental Botany* 51 (352): 1781-1788.
- Tian YC, Zheng JB, Yu HM, Liang HY, Li CQ, Wang JM (2000)** Studies of Transgenic Hybrid Poplar 741 Carrying Two Insect-resistant Genes. *Acta Botanica Sinica* 42 (3): 263-268.

- Tinland B (1996)** The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends in plant science* 1 (6): 178-184.
- Tränkner C, Lehmann S, Hoenicka H, Hanke MV, Fladung M, Lehnhardt D, Dunemann F, Gau A, Schlangen K, Malnoy M, Flachowsky H (2010)** Over-expression of an FT-homologous gene of apple induces early flowering in annual and perennial plants. *Planta* 232: 1309-1324.
- Tsai CJ, Xue LJ (2015)** CRISPRing into the woods. *GM Crops & Food* 6 (4): 206-215.
- Turck F, Fornara F, Coupland G (2008)** Regulation and identity of florigen: FLOWERING LOCUS T moves center stage. *Annual Review of Plant Biology* 59: 573-594.
- Tuskan GA, DiFazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A, Schein J, Sterck L, Aerts A, Bhalerao RR, Bhalerao RP, Blaudez D, Boerjan W, Brun A, Brunner A, Busov V, Campbell M, Carlson J, Chalot M, Chapman J, Chen GL, Cooper D, Coutinho PM, Couturier J, Covert S, Cronk Q, Cunningham R, Davis J, Degroeve S, Déjardin A, Depamphilis C, Detter J, Dirks B, Dubchak I, Duplessis S, Ehlting J, Ellis B, Gendler K, Goodstein D, Gribskov M, Grimwood J, Groover A, Gunter L, Hamberger B, Heinze B, Helariutta Y, Henrissat B, Holligan D, Holt R, Huang W, Islam-Faridi N, Jones S, Jones-Rhoades M, Jorgensen R, Joshi C, Kangasjärvi J, Karlsson J, Kelleher C, Kirkpatrick R, Kirst M, Kohler A, Kalluri U, Larimer F, Leebens-Mack J, Leplé JC, Locascio P, Lou Y, Lucas S, Martin F, Montanini B, Napoli C, Nelson DR, Nelson C, Nieminen K, Nilsson O, Pereda V, Peter G, Philippe R, Pilate G, Poliakov A, Razumovskaya J, Richardson P, Rinaldi C, Ritland K, Rouzé P, Ryaboy D, Schmutz J, Schrader J, Segerman B, Shin H, Siddiqui A, Sterky F, Terry A, Tsai CJ, Uberbacher E, Unneberg P, Vahala J, Wall K, Wessler S, Yang G, Yin T, Douglas C, Marra M, Sandberg G, Van de Peer Y, Rokhsar D (2006)** The Genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa* (TORR. & GRAY). *Science* 313: 1596-1604.
- Udvardi MK, Czechowski T, Scheible WR (2008)** Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *The Plant Cell* 20 (7): 1736-1737.
- Umezawa T (2003)** Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochemistry Reviews* 2 (3): 371-390.
- USGS [United States Geological Service] (2011)** Significant earthquakes. Magnitude 9.0 – Near the east coast of Honshu, Japan, 2011 March 11 05:46:24 UTC. <http://earthquake.usgs.gov/earthquakes/eqinthenews/2011/usc0001xgp/>. Abgerufen am 03.08.2015.
- Van Acker R, Vanholme R, Storme V, Mortimer JC, Dupree P, Boerjan W (2013)** Lignin biosynthesis perturbations affect secondary cell wall composition and saccharification yield in *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnology for Biofuels* 6 (1): 46.
- Van Aken B (2008)** Transgenic plants for phytoremediation: helping nature to clean up environmental pollution. *Trends in biotechnology* 26 (5): 225-227.
- Vander Mijnsbrugge K, Beeckman H, De Rycke R, Van Montagu M, Engler G, Boerjan W (2000 a)** Phenylcoumaran benzylic ether reductase, a prominent poplar xylem protein, is strongly associated with phenylpropanoid biosynthesis in lignifying cells. *Planta* 211 (4): 502-509.
- Vander Mijnsbrugge K, Meyermans H, Van Montagu M, Bauw G, Boerjan W (2000 b)** Wood formation in poplar: identification, characterization, and seasonal variation of xylem proteins. *Planta* 210 (4): 589-598.
- Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W (2010)** Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiology* 153 (3): 895-905.
- Van Montagu M (2011)** It is a long way to GM agriculture. *Annual review of plant biology* 62: 1-23.
- Vogel HJ (1953)** Path of ornithine synthesis in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 39 (7): 578-583.
- Weisgerber H (2006)** *Populus alba*. In: Schütt P, Weisgerber H, Schuck HJ, Lang U, Stimm B, Roloff A (Herausgeber) *Enzyklopädie der Laubbäume*. Nicol Verlagsgesellschaft, Hamburg: 367-377.
- Wilkins O, Nahal H, Foong J, Provart NJ, Campbell MM (2009)** Expansion and diversification of the *Populus* R2R3-MYB family of transcription factors. *Plant Physiology* 149 (2): 981-993.
- Willing RR, Pryor LD (1976)** Interspecific Hybridisation in Poplar. *Theoretical and Applied Genetics* 47: 141-151.

- Wood DW, Setubal JC, Kaul R, Monks DE, Kitajima JP, Okura VK, Zhou Y, Chen L, Wood GE, Almeida Jr NF, Woo L, Chen Y, Paulsen IT, Eisen JA, Karp PD, Bovee Sr D, Chapman P, Clendenning J, Deatherage G, Gillet W, Grant C, Kutuyavin T, Levy R, Li MJ, McClelland E, Palmieri A, Raymond C, Rouse G, Saenphimmachak C, Wu Z, Romero P, Gordon D, Zhang S, Yoo H, Tao Y, Biddle P, Mark J, Krespan W, Perry M, Gordon-Kamm B, Liao L, Kim S, Carol Hendrick C, Zhao ZY, Dolan M, Chumley F, Tingey SV, Tomb JF, Gordon MP, Olson MV (2001) The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294 (5550): 2317-2323.
- Xue LJ, Alabady MS, Mohebbi M, Tsai CJ (2015) Exploiting genome variation to improve next-generation sequencing data analysis and genome editing efficiency in *Populus tremula* × *alba* 717-1B4. *Tree Genetics & Genomes* 11 (4): 1-8.
- Ye X, Busov V, Zhao N, Meilan R, McDonnell LM, Coleman HD, Mansfield SD, Chen F, Li Y, Cheng ZM (2011) Transgenic *Populus* trees for forest products, bioenergy, and functional genomics. *Critical Reviews in Plant Sciences* 30 (5): 415-434.
- Yin TM, Zhang XY, Huang MR, Wang MX, Zhuge Q, Zhu LH, Wu RL (2002) Molecular linkage maps of the *Populus* genome. *Genome* 45: 541-555.
- Young C, Prince AS, Figurski DH (1985) *korA* function of promiscuous plasmid RK2: An autorepressor that inhibits expression of host-lethal gene *kilA* and replication gene *trfA*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82 (21): 7374-7378.
- Yuan JS, Tiller KH, Al-Ahmad H, Stewart NR, Stewart Jr CN (2008) Plants to power: bioenergy to fuel the future. *Trends in Plant Science* 13 (8): 421-429.
- Zaenen I, Van Larebeke N, Teuchy H, Van Montagu M, Schell J (1974) Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *Journal of molecular biology* 86 (1): 109-127.
- Zambryski P, Holsters M, Kruger K, Depicker A, Schell J, Van Montagu M, Goodman HM (1980) Tumor DNA structure in plant cells transformed by *A. tumefaciens*. *Science* 209 (4463): 1385-1391.
- Zhang J, Elo A, Helariutta Y (2011) *Arabidopsis* as a model for wood formation. *Current Opinion in Biotechnology* 22 (2): 293-299.
- Zhao Q, Dixon RA (2011) Transcriptional networks for lignin biosynthesis: more complex than we thought? *Trends in plant science* 16 (4): 227-233.
- Zhong R, Lee C, Zhou J, McCarthy RL, Ye ZH (2008) A battery of transcription factors involved in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20 (10): 2763-2782.
- Zhong R, McCarthy RL, Lee C, Ye ZH (2011) Dissection of the transcriptional program regulating secondary wall biosynthesis during wood formation in poplar. *Plant Physiology* 157: 1452-1468.
- Zhong R, Ye ZH (2007) Regulation of cell wall biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 564-572.
- Zhou X, Jacobs TB, Xue LJ, Harding SA, Tsai CJ (2015) Exploiting SNPs for biallelic CRISPR mutations in the outcrossing woody perennial *Populus* reveals 4-coumarate: CoA ligase specificity and redundancy. *New Phytologist* 208 (2): 298-301.

Danksagungen

Mein erster Dank gilt **PD Dr. Matthias Fladung**, der sich wie ein Löwe für das Projekt PopMass eingesetzt hat. Mein Doktorvater verstand es immer, mir die nötigen Freiräume zu lassen, um mich fachlich und persönlich weiterzuentwickeln. Dennoch war er stets zur Stelle, wenn guter Rat gefragt war, und hat mich an seinem reichen Erfahrungsschatz teilhaben lassen.

Ich danke **Prof. Dr. Hans-Peter Mühlbach** für die Übernahme des Gutachtens dieser Dissertation und die herzliche Unterstützung während meines Studiums, nicht zuletzt als Mentor im Master-Studium.

Ebenfalls danke ich **PD Dr. Dirk Warnecke** für die Mitbetreuung meines Promotionsstudiums. Damit verbunden war ein interessanter fachlicher und persönlicher Austausch, der mich sehr bereichert hat.

Meine Doktorarbeit wurde im Rahmen des Projekts "Development and use of novel gene technologies to increase biomass yield in the woody perennial *Populus spec.* - PopMass" ermöglicht, das als Teil des Forschungsprogramms **Plant2030** vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (Förderkennziffer 0315972D) durchgeführt wurde. Den **Projektpartnern** danke ich für die gute Zusammenarbeit. Insbesondere möchte ich **Dr. Kay Hettrich** und **Dr. Hendrik Wetzel** für die detailreichen Biomasseanalysen danken. Für die Durchführung der UMSP-Analysen danke ich der Arbeitsgruppe um **Dr. Uwe Schmitt** vom Thünen-Institut für Holzforschung.

Grundlage für die Auswahl „meiner“ Kandidatengene war eine Transkriptomanalyse, die im Projekt „TreeForJoules“ durchgeführt wurde. Für die Bereitstellung dieser Daten danke ich meinen Kolleginnen **Dr. Birgit Kersten** und **Dr. Birte Pakull**. Mein weiterer Dank gilt Dr. Birgit Kersten für ihre wertvolle bioinformatische Zuarbeit sowie die Bereitstellung von Sequenzdaten des *P. × canescens*-Klons P1. Wann immer es nötig und möglich war, konnte ich so neben der Datenbanksequenz von Nisqually-1 auch auf die Sequenz „meines“ Klons zugreifen. Das war eine wirkliche Bereicherung!

Je voudrais remercier **Jean-Charles Leplé** et **Marie-Claude Lesage-Descauses**, Institut national de la recherche agronomique au Orléans, pour m'avoir accueilli chaleureusement dans leur laboratoire et m'avoir enseigné la PCR quantitative. Der Auslandsaufenthalt wurde finanziert im Rahmen der COST-Aktion 0509 aus Fördermitteln der Europäischen Union. Für die Unterstützung bedanke ich mich stellvertretend bei **Cristina Vettori**, CNR Italien.

Ich danke allen Kolleginnen und Kollegen am Thünen-Institut für Forstgenetik für das angenehme Arbeitsklima. Namentlich möchte ich „meinem“ technischen Assistenten **Olaf Polak** für die tatkräftige Unterstützung danken, sowie **Jennifer Lüneburg, Susanne Jelkmann, Denise Lehnhardt, Doris Ebbinghaus, Anke Schellhorn, Manuela Will, Valentina Briones, Katrin Groppe, Caren Heitmann, Maike Paulini** und nicht zuletzt **Angelika Worm**.

Ferner danke ich dem Team der Gärtnerei, allen voran **Gundel Wiemann, Monika Spauszus, Matthias Hunger** und **Rainer Ebbinghaus**, die sich akribisch um die Pflege meiner Pappeln - die stets zu groß oder deutlich zu klein, aber niemals „normal“ waren - gekümmert haben.



*"Trees are truly amazing!"
(Jansson et al. 2010)*

Für die Rechtschreibkorrektur dieser Dissertation danke ich herzlich **Karola Werner-Schmidt-Dietrich!**
Abschließend danke ich meiner Mutter **Angelika Brüggemann** für ihre immerwährende Unterstützung.
Liebe Mama, ich hab's geschafft!

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den 08. September 2016

A Anhang

A.1 Kandidatengene

Die kodierenden Sequenzen der fünf Kandidatengene, die aus den Transkriptomanalysen ausgewählt wurden, sind nachfolgend im FASTA-Format aufgeführt:

>POTRI.007G008600.1 CDS

```
ATGTCCCCTG TATCACCTCG TAGGAACCCAG AGATCAAAAAG GTTTTAAAGGT CAAGCATGCT CTGCAAAATAT GTCTTCTGAT CGGTGTTTGT GGCTGGCTAC
TTTACCAAGT CAAGCACTCT CATGATAAGA AAGCAGCATA TGAGAAAAAGT GTGAAAAACAG AGAATGATGT TGTAAAATTA GGGAGAAAAGG ACCTCCAGCC
TGAAGTTAAA GAAAAATTTCA TTGGAGATGA GAGGCACAAG GAGGAGGAAG AGGAAGAGAG CAAGAGCGAA GAAGAAAAGCA AACCTGATGA TAACACAGGA
ACAGAGGGTG GCGATGATGA GATTTCATGAT CATTTCATG ATAAGACAGA AGAAGGAGCT GAGCGTAGAG AAGATTCTAT AGATGGGGAG AAGGAAGCAG
AGGATAAGAC TGAAGAGGGG GTTAGGCATA GAGAGGATTC TGTAGATGGA GAGAAGGAAA GGGAAAGTGAG AAATGAGAAC GTCAGTGAGG GGATGGAGAG
GGAGGGTACA AGGGATAATG TTAATGATGA CAGAGAGAAG GGAGAGATCA GGGAGAATTA TAGTGAGGAT AAGGAGACTG AAGAGAGCAA AAGGAGTGAT
GGTGAGGATA AGGAGAATGT AGAGGGAAAA GAGATTGAAA TTGAAGAGAG CAAAGAAAAGT GAAAGCATAA ACAGAGAGAC TGAAGAAAAGC AAGGAGAATG
AAGAGGGCAA AGAAGGTGAA AGCGAGCACA GAGAGAGAGA GAGGAAGGAG AGTGAAGAGA GCAAAGAAAG TGAAGCGCAA CACAGAGGGA GTGAAGACAG
CAAGGAGAAT GAAGAGAGCA AAGAAGATGA AAGCGAGCAC AGAGAAAAGTG AAGAGAGGAA GGTGAATGAA GAGAGCAAAG AAAGTGAAGG CGAACACAGA
GAGAGTGAAG ACAGCAAGGA GAATGAAGAG AGAAAAGAAA GTGAAAAGTGA GCACAGAGAG ACTGAAGACA GCAAGGAGCA CGAAATGAGC GAAGAGACTG
CAATGAGAAA TAAAGAAAAA GCAAGTGAAG AAAAGGAAAAG GGTGAAGAG AGTCAGCAGA AGGAAAATAA AGAGTTTGTG GAACAAAAGCA ATGAGGAAGA
AAATAAAGAA AAAGAGTTAG AAGATAAAGT TACAATGGAG GATCAAGTTA ATGATGGAAA TAATGCACAT AGTGAGGAGG CAAGAGAGGA ACATTACAAG
GGGATGATG CATCCAGTGC AGTAGTCCAT CAAATTCAGA ATGATACGCC TGAAGAGGAG CACGGTGATT TGAAGAAATC TGGTGAGGGA GAGCCAGTGG
AAAACAAGA GAAGAAATCAG TTAGAGTTTG AAAATAGAAC AAATAACACT GAAGTGGTTG ACTTCAATCA AAATGAAAGT CCAAGGTTGA AAGAAATCTGA
CTCGGGAGAA AATGATGATT CCACAAATGC AAAACAAGT GAAGAGGGTA CTAATGAAA TAATAAGCAA GACTCGGAGG AAGGTTCCCA TGACTACTCC
ACAGTAGCAA CAGTGAATGA ACAGCAGCAT GAAGATTCTA ACTCCATTCC AGTTACTGCA GATAACGTAG TATCAAAAAG AGAGGAGTCA ACCATGAATA
ATGTTGTGCT AGAGCAAAC GAGAAACCTG AATCAGTTGC TAGCAACCCAG CAATCAGATT CAAACTCAAC ACATTCTAGT ACAACCAATA ATGGAGATTC
AACAAATGTA GAATCAATGG GCTCTAGCAA TTCTGAATCT GTTGCCTCAA ATGGACAGAC CAACTCCATT ACACCTTTGT TGACAAGCCA AAATGGTGAT
GCAGCTCAGA TTGACAAGTC CAACAGTAGT TCTAGTGTG AAGGGAGTAC GGAATTTGTT CTACCATCAA GCACAAATGA AAGTGCTGAT GCTGGGCAAA
CCGGACATGG TGATTCTCTG CACTCTGAAC AGAAAAGCAC ATCCTCAAAC ACAATAACG ATGCTAATAC TGGCCAAGAG CAACAAGGTA ACAATTTGGAG
CTCTCAAGAG AAAGATAAGT TATCAATCAG TAGTAACAAT GATGGTGTG ACCAGAGTTT TGCTACCAGC AATGCAAAACA ACAACAACAA TGAATAATGTC
TACTACTGAT CAAGCCAAAA AGAACAGGTT GATCCTAACA ATGGCAATGC TGACCAGAAC AGCCACTCAA ACTACAATGG CAATGCCAAT GAAAACACAG
ATGCAAAACCA AAACGAGCAA GTTGAATCTT CTGATTCTTC AAAGTCTCGA GAAGAGGGAG ATGTATCCAC AAACACTAGT AGCAGCATCG ATGTGAAGCA
GAATGGTTCT GTTGAATCTT CCATTTCTCA AGAAGAAAAG GAGGCTCGAA CGGACTTGGG AACTTTGCCT GGTCTGTGAA CCAAGGAGC CAGTGGTGGA
GATGCAGCTA CGGAGTGA
```

>POTRI.002G034400.1 CDS

```
ATGGCTGATA AAAGCAAGAT TCTGATCATT GGAGTACTG GTTACATAGG AAAATTCATC GTGGAGGCAA GCGCCAAGGC CGGTCACCCC ACTTTCGCCT
TGGTTAGAGA GAGTACAGTC TCTGATCCTG TCAAACGAGA ACTTGTCTGAG AAATTCAGA ACTTAGGCGT CACTTTGATC CATGGAGATG TCGACGGCCA
TGACAATTTG GTGAAGGCAA TCAAGCAGGT GGATGTGGTG ATATCAGCGA TTGGGAGCAT GCAAAATAGCA GATCAAACCA AGATCATTGC CGCCATTA
GAAGCTGGCA ATGTCAAGAG ATTCTTCCCT TCAGAATTTG GAATGGATGT GGATCATGTC AATGCTGTTG AGGCTGCAAA AACTGCATTT GCAATGAAGG
CTCAGATTCC ACGTGCCATC GAGGCTGCA GATTCCCTA CACTTATGTG CTTTCCAAC TCTTTGCTGC ATATTATCTC CCCACATTGG CACAGTTTGG
ACTTACTGCT CCTCCGAGAG ACAAGATCAC CATCCTCGGA GATGGCAATG CCAAGTTGGT TTCAATAAG GAAGATGACA TTGGAACCTA CACCATCAA
GCTGTGGATG ATGCAAGAAC CTTGAACAAG ACTGCTCTAA TCAAGCCTCC TAAAAACACC TACTCATTCA ATGAGCTTAT TGATCTATGG GAGAAAAAGA
TTGGCAAAAC CCTCGAAAAA ACCTTTGTTC CTGAAGAGAA ACTTCTGAAG GACATCCAAG AGTCTCCGAT TCCGATTAAT ATTGTTCTGT CAATCAACCA
CTCAGCCCTC GTTAATGGTG ACATGACCAA CTTTGAGATT GACCCATCAT GGGGCTTGA GGCCTCTGAG CTATATCCAG ATGTCAAAATA TACCACCGT
GAAGAGTACC TTGATCAGTT TGCTGTA
```

>POTRI.005G123800.1 CDS

```
ATGGCATATA TGTGTGACA TAGTGGAAT CTAATGGCAA TAGCCCAACA AGTTATTAAG CAAAAACAAC AACAAGAACA ACAGCAACAA CAAAGCCACC
ACCCCAAGCA ACAATTTCTT GGCCTAAACC CTTTTCTTT AAATCCTTGG CCGAGTACTA CAATGTCTGC TAACCAAAAC TTGGGTTATG GGCTCTCGG
CCCGGCTGCC TTCTCTGACC CGTTTCAGAG TGGACCAGAT ACAGGTGACC CACCCGGGTT TAGTTTCTCG AATATGGAGC ACCACCACTC GAGTGGGTTT
CGTTTTCTG ATTTTACTG AGCTGGCGGT GAGTTTACT CTGATGAGTG GATGGATAGT TTAATGAACG GTGGAGATTG GACGGATAGT TCTAATCTC
CTTCTGGTTG TGACGCGTGG CAAAACAATG CTGATTTGCG CATTTACCAG TCTGATCCGT TTAACACTAG CCCAGTCTGA CTCACTGTGC GCTGCTCTC
ACCGTCCGAT CTTAACCGGG TTATCTCTAA CTCGCTCTGG GCTGACCCAT CTCTCTCA AGAAATCAAG CCCAAAACAT CGCCTCCACA ACAGCCTCCG
CCAACAGTAA AAAACGAAGT CGTCTTGGG TCTAAAGAAA TAGTAGAGTT ATCTTCTGTC CCGGTTTTGA AAGCACTTGT TGAGTGTGCT CAACTTGTG
AGTCCAAGC TGATCAAGCT GTGAATCAT TGATTAGGTT CAAGGAATCG GTGAGTGAGA ACGGTGATCC AGGTGAGCGC GTTGGTTTCT ACTTCGTTAA
AGGATTATGC AGAAGAGTTG CTGTAGGAGA GCTTATGATG TTGAAAACCT TTCTATGAGC AACAAGTGAA GAGTTCATT TGTGTTATAA AGCTTTGAAT
GATGCTTGTG CTTATTCAA GTTTGCTCAT TTGACAGCAA ATCAAGCAAT TCTTGAAGCG ACCGAGAAAAG CAAGCAAGAT TCACATAGTT GATTTTGGTA
TCGTTCAAGG AATTCAATGG GCTGCTCTTT TACAAGCTTT AGCTACGCGT TCAGCTGGAA AACCTGTTAG AATCCGAATC TCAGGTATAC CTGCTCCAGT
TCTTGGTAAG AACCCAGCTG CTTCTCTTTT AGCTACTGGT AATAGGCTTC TTGATTTTGC AAAGCTTCTT GATTTGAATT TTGAGTTTGA GCCTATTCTG
ACTCCAATTC AGGAGTTAAA TGAATCTTGT TTTCCGGTTG AGCCGGATGA GGTTTTGGCT GTCAATTTCA TGCTTCAGTT GTATAATTTG TTGGGTGAGA
CTCCAGGAGC CGTGGAAACC GCTTTAAAGA TGGCTAAATC GTTGAACCCG AGAATTTGTA CTCTTGGTGA ATATGAAGTT AGTTTGAACC GGGTCCGGTA
CTTGACCCGG TTTAAGAACG CTTTGAAGTA CTACACTGCT GTTTTGTAGT CTCTTGATCC TAACATGAGT AGAGACTCAC AAGAGAGGCT TCAGGTTGAG
AGATTTGTTAT TGGGTCGTAG AATTTCTGGT GTTGTAGGGC CAGATGGAAT TAGAAGGGAG AGGATGGAGG ATAAAGAGCA ATGAGGGGTT TTAATGGAAA
GCTCGGGTTT CGAATCGGTT TCGCTTAGCC ATTATGCAAT GAGTCAGGCT AAAATACTTT TATGGAATTA CAATTCAGT ACTATGTATT CTCTTGATGA
TTCTCAACCT GGGTCTTAA CTTTAGCCTG GAATGAGGTG CCACTACTCA CAGTTTCTGC ATGGCGATAA
```


CAAGTGGCAA CCTCCCgTGC TTCTGcTCAC CTTTACCgCC TGGCAACTGG CGGCCGGAGG ACTTCTGCTC GTTCCAGTAG CTTTAGTGTT TGATCCGCCA
 ATCCCgAAGC CAACAGGAAC CAATGTTCTC GGCctGGCGT GGCTCGGaCC TGATCGGAGC GGGTTTAACV TACTTCCtTT GGTTCGGGG GATCTCGCGA
 CTCGAACCTA CAGTTGTTTT CTTACTGGGC TTTCTCAGCC CCAGATCTGG GGTCGATCAG CCGGGGATGC ATCAGGCCGA CAGTCGGGAAC TTCGGGTCCC
 CGACCTGTAC CATTCCGTGA GCAATGGATA GGGGAGTTGA TATCGTCAAC GTTCACTTBT AAAGAAATAG CGCCACTCAG CTTCTCAGC GGCTTTATCC
 AGCGATTTC TATTATGTCG GCATAGTTCT CAAGATCGAC AGCCTGTAC GGTAAAGCGA GAAATGAATA AGAAGGCTGA TAATTCGGAT CTCTGCGAGG
 GAGATGATAT TTGATCACAG GCAGCAACGC TGTGTATCG TTACAATCAA CATGCTACCC TCCGCGAGAT CATCCGTGTT TCAAACCCGG CAGCTTAGTT
 GCCGTTCTTC CGAATAGCAT CGGTAACATG AGCAAAGTCT GCCGCCTTAC AACGGCTCTC CCGCTGACGC CGTCCGGAC TGATGGGCTG CCTGTATCGA
 GTGGTGATTT TGTGCCGAGC TGCCGGTCGG GGAGCTGTTG GCTGGCTGGT GGCAGGATAT ATTGTGGTGT AAACAATTG ACGCTTAGAC AACTTAATAA
 CACATTGCGG ACGTTTTTAA TGTACTGGGG TGGTTTTTCT TTTACCAGT GAGACGGGA ACAGCTGATT GCCCTTACC GCCTGGCCCT GAGAGAGTTG
 CAGCAAGCGG TCCACGCTGG TTTGCCCCAG CAGGCgAAAA TCCTGTTTGA TGGTGGTTCC GAAATCGGCA AAATCCCTTA TAAATCAAAA GAATAGCCCG
 AGATAGGGTT GAGTGTGTTT CCAAGTTTGA ACAAGAGTCC ACTATTAAG AACGTGGACT CCAACGTCAA AGGGCGAAAA ACCGTCTATC AGGGCGATGG
 CCCACTACGT GAACCATCAC CCAAATCAAG TTTTTTGGGG TCGAGGTGCC GTAAAGCACT AAATCGGAAC CCTAAAGGA GCCCCCGATT TAGAGCTTGA
 CGGGGAAAGC CGGCGAACGT GCGGAGAAA GAAGGGAAGA AAGCGAAAGG AGCGGGCGCC ATTCAGGCTG CGCAACTGTT GGGAAAGGCG ATCGGTGCGG
 GCCTCTTCG TATTACGCCA GCTGGCGAAA GGGGATGTG CTGCAAGCGC ATTAAGTTGG GTAACGCCAG GGTTCCTCCA ATCAGCAGCT TGTAACCGA
 CGGCCAGTGA ATTCGAGCTC GGTACCCGGG GATCCTCTAG AGTCGACCTG CAGGCATGCA AGCTTGCATG CCTCGAGTC ACTGGATTTT GGTAAAAAGG
 GAATTAGAAA TTTTATTGAT AGAAGTATTT TACAAATAGA GAATACAATA ACTAGAAGGG GTTC

A.2.1.2 Primersequenzen

Tab. A1: Primer für die Sequenzierung des Überexpressionsvektors A122

#16	ATG GAT TGC ACG CAG GTT CTC	#1817	GCC GGC CAG CGA GAC GAG
#34	TGG CTA CCC GTG ATA TTG CTG	#1854	CAC TCA ACC CTA TCT CGG
#35	GAG AAC CTG CGT GCA ATC CAT	#1856	CAG CCG GCG CTT TAC TGG
#309	ACG CTA TGT CCT GAT AGC GGT	#1859	CAA GCG GAT GGC TGA TG
#318	AAG AAG GCG ATA GAA GGC GA	#1873	TTG GCA AGG TCA TGA TGG
#439	GCT GAC TCG ATC CTT AGT ATG C	#1885	TGC AAA CGC GCC AGA AAC
#491	ATC CGA GGA GGT TTC CCG	#1887	GTG CGT CCC GAG CGA TAC TG
#495	AAT TAG GGT TCT TAT AGG GTT TCG CTC	#1894	GCT TTA TCC AGC GAT TTC C
#608	TTA CCC GCC AAT ATA TCC TGT	#1895	GGA AAT CGC TGG ATA AAG C
#1236	AGA ATG CAA CAA GCA GAC AAG	#1898	GCT GGC GGA GAA TCA TAC
#1237	CCA ATG AAC AAT TGC GTC TCT	#1900	TAT TAA GTG CGC CGA GGA
#1571	GAT TTG TAG GAG AGA GAC TGG	#1902	CAG CTG GCG TAA TAG CGA A
#1572	GGA TAT ATT GGC GGG TAA AC	#1904	ATT CCA GGT GCC CAA CG
#1613	TAA GGG AGT CAC GTT ATG ACC	#1912	CTA CTG TCC TTT CGA TGA AG
#1614	GGA TTG AGA GTG AAT ATG AGA C	#1913	TCT CAA TAG CCC TCT GGT C
#1641	GAA TGC AAC AAG CAG ACA AGT G	#1914	GAT CGT TCA AAC ATT TGG C
#1642	TGC CTT CTC CCA AGA GTT TAC G	#1915	CGA TAT CTT GCT GCG TTC GG
#1643	CTG CAA CAG ATT GAG CAA CAG C	#1918	TAG ACG CCT TCG ACG AAG
#1644	GCG TCT CTA CTT CAG AAC TTG G	#1919	GTG ATT GTC GAT GGA TTG G
#1695	CCC TTC CTT TCT CGC CAC GTT CG	#1931	AGA GCC TGA TGC ACT CC
#1696	CTT GAT TTG GGT GAT GGT TC	#1932	GAC ATG ATG CTA TGG CTG
#1697	TGC TGC AAG GCG ATT AAG TTG G	#1933	ACG CGT ATG ACA GTC TCC
#1698	AAC AAC ACT CAA CCC TAT CTC G	#1934	CAT GTG CTG CCT CAG ATT C
#1699	CGA ACG TGG CGA GAA AGG AAG G	#1935	GAC TTC GCC AAA CCT GCC
#1700	CGC TTG GTC GGT CAT TTC G	#1936	GCC ACC GCT AAC CTG TC
#1701	GCC CAA CCT TTC ATA GAA GG	#1943	GGG TGT GAA GTT GCC TCG
#1702	CGT TGG CTA CCC GTG ATA TT	#2011	TAG GCC GAC AGG CTC ATG C
#1703	CTG CTT GCC GAA TAT CAT GG	#2012	GAT AGA CGC CTT CGA CGA AG
#1802	CGA ATA GCA TCG GTA ACA TG	#2013	TCT TCA TCC TCT TCG TCT TG
#1803	CAT GTT ACC GAT GCT ATT CG	#2014	AGT TTC CCA CAG ATG ATG TG
#1804	ACG CGA AGT TCC GAC TGT C	#2024	GTC TGA CGC GGT GGA AAG
#1805	GTC ACT TGT CTG CTT GTT GC	#2025	CTC ATC TGT CAG CAC TCT GC
#1808	GTG CTC AGA ATT ACG ATC AG	#2026	ACC AGG CGG GTC AAA TCA GG
#1814	TGG AAG TAA AGG GAC CCG AAC ATC	#2027	CAT CGC TCG CAT CGT GTC

Tab. A2: Primer für die Sequenzierung des Überexpressionsvektors A137 (Fortsetzung)

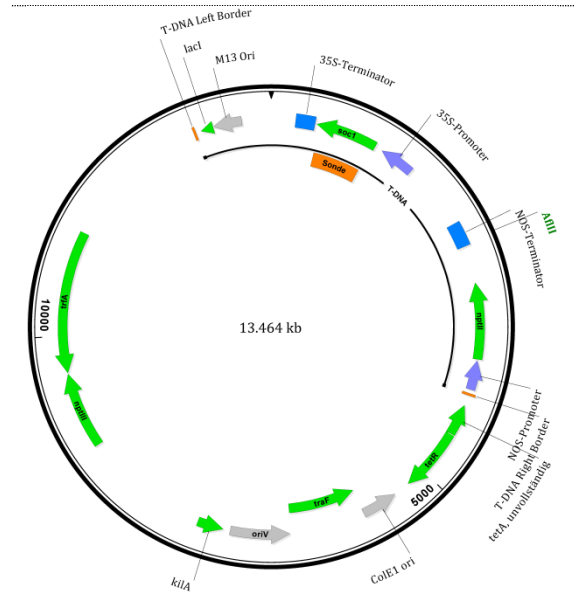
#318	AAG AAG GCG ATA GAA GGC GA	#1872	AAG ACC GAC CGC CTT TC
#437	GGA AGT TCA TTT CAT TTG GAG AG	#1873	TTG GCA AGG TCA TGA TGG
#438	AAA TAG CGA TCA TAG CGT TCA AGT	#1878	CCT AAT GCT CTT GAT AGC
#608	TTA CCC GCC AAT ATA TCC TGT	#1880	TGC GCG ATC TGG TTC ACT
#1340	AAA CTC TCT CCT TCC AGC TTG	#1885	TGC AAA CGC GCC AGA AAC
#1341	AAG GTG AAT TAT CAC CGT CAC	#1887	GTG CGT CCC GAG CGA TAC TG
#1569	GGT TCC GAT TTA GTG CTT TAC G	#1888	GTT GCC ACT TGC GGG TCA G
#1570	CCT TTG ACG TTG GAG TCC ACG	#1889	GAC ACT CTC GTC TAC TCC
#1571	GAT TTG TAG GAG AGA GAC TGG	#1890	TCA TGG TCA TAG CTG TTT CCT GTG
#1572	GGA TAT ATT GGC GGG TAA AC	#1891	CCT TAT TAG CGT TTG CCA TC
#1574	TAT CAG CGC TCC AGA AGA AGG	#1904	ATT CCA GGT GCC CAA CG
#1575	CGC AGG CAA ATT GCA CCA ACG	#1917	TCC TCT GTT TAT CGG CAG
#1791	CCA ACT TAA TCG CCT TGC AGC	#1919	GTG ATT GTC GAT GGA TTG G
#1792	GCT GCA AGG CGA TTA AGT TGG	#1931	AGA GCC TGA TGC ACT CC
#1793	CAC CAC TCG ATA CAG GCA GC	#1932	GAC ATG ATG CTA TGG CTG
#1794	GCT GCC TGT ATC GAG TGG TG	#1933	ACG CGT ATG ACA GTC TCC
#1795	GCA TGT TGA TTG TAA CGA TGA C	#1934	CAT GTG CTG CCT CAG ATT C
#1797	GCT TCA GGC AGG CGC TGC TC	#1935	GAC TTC GCC AAA CCT GCC
#1798	CCG TCT ACG CCG ACC TCG TTC	#2013	TCT TCA TCC TCT TCG TCT TG
#1799	GAA CGA GGT CGG CGT AGA CGG	#2024	GTC TGA CGC GGT GGA AAG
#1800	GTC GCC TAA GGT CAC TAT CAG	#2025	CTC ATC TGT CAG CAC TCT GC
#1801	CTG ATA GTG ACC TTA GGC GAC	#2026	ACC AGG CGG GTC AAA TCA GG
#1810	CTA GCA GAG CGG CAG AGA TGA ACA	#2027	CAT CGC TCG CAT CGT GTC

A.3 Transformationsvektoren

In den folgenden Tabellen A3 bis A20 sind die Ti-Plasmide der in dieser Arbeit verwendeten Transformationsvektoren aufgeführt. Die Ti-Plasmide von A122 und A137 wurden im Rahmen dieser Arbeit sequenziert.

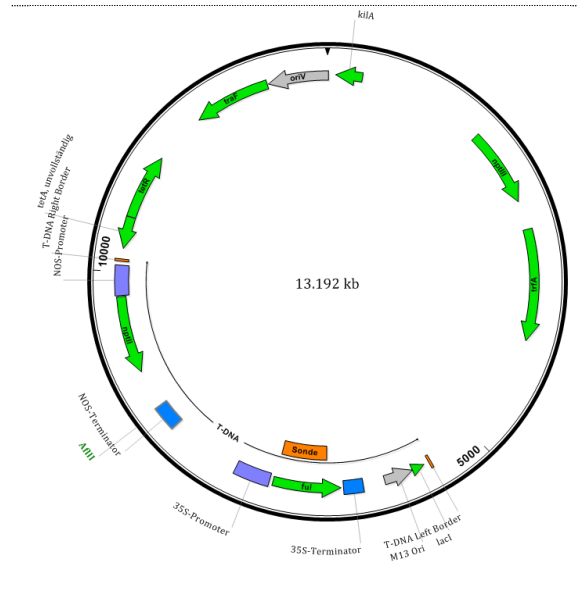
Tab. A3: Ti-Plasmid von A122

Zielgen:	
<i>SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1</i>	
Anwendung:	Resistenzgen:
RNA-Interferenz	<i>NPTII</i> für Kanamycinresistenz
Durchgeführte Transformationen:	
N 94	
Southern Blot-Restriktionsenzym:	
<i>AflIII</i>	



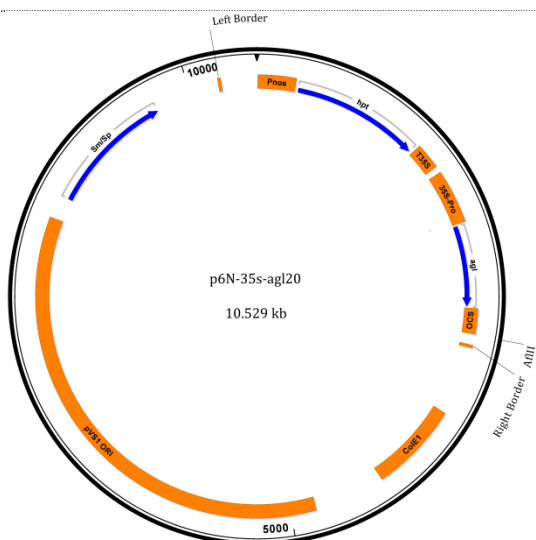
Tab. A4: Ti-Plasmid von A137

Zielgen:	
<i>FRUITFULL</i>	
Anwendung:	Resistenzgen:
RNA-Interferenz	<i>NPTII</i> für Kanamycinresistenz
Durchgeführte Transformationen:	
N 94, N 352, N 407	
Southern Blot-Restriktionsenzym:	
<i>AflIII</i>	



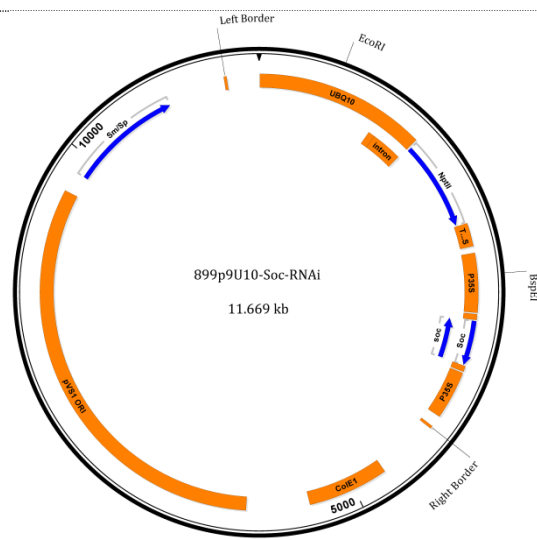
Tab. A5: Ti-Plasmid von A141

Zielgen:	
<i>SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1</i>	
Anwendung:	Resistenzgen:
RNA-Interferenz	<i>HPT</i> für Hygromycinresistenz
Durchgeführte Transformationen:	
N 352, N 407	
Southern Blot-Restriktionsenzym:	
<i>AflII</i>	



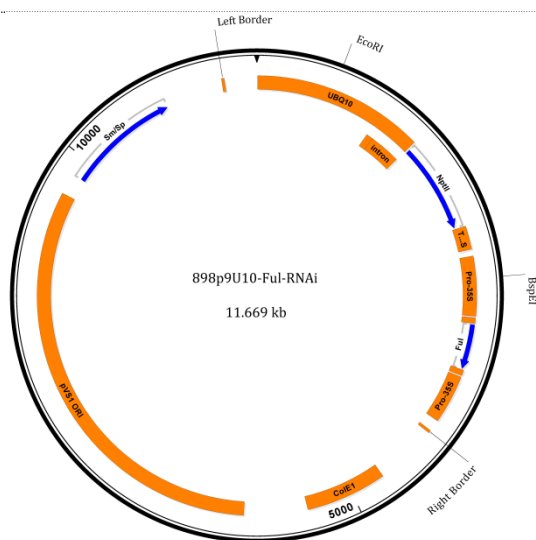
Tab. A6: Ti-Plasmid von A179

Zielgen:	
<i>SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1</i>	
Anwendung:	Resistenzgen:
RNA-Interferenz	<i>NPTII</i> für Kanamycinresistenz
Durchgeführte Transformationen:	
N 266, N 271	
Southern Blot-Restriktionsenzyme:	
<i>BspEI</i> oder <i>EcoRI</i>	



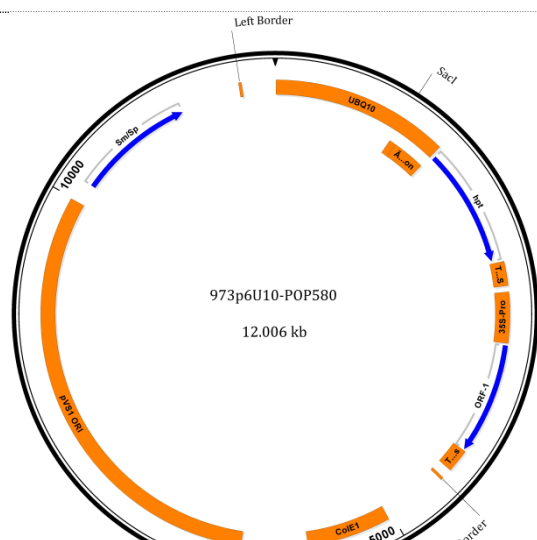
Tab. A7: Ti-Plasmid von A180

Zielgen:	
<i>FRUITFULL</i>	
Anwendung:	Resistenzgen:
RNA-Interferenz	<i>NPTII</i> für Kanamycinresistenz
Durchgeführte Transformationen:	
N 267, N 272, N 316	
Southern Blot-Restriktionsenzyme:	
<i>BspEI</i> oder <i>EcoRI</i>	



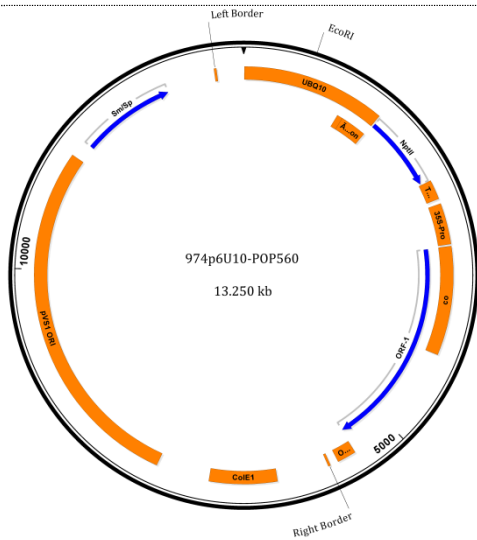
Tab. A8: Ti-Plasmid von A185

Zielgen:	
Potri.002G034400	
Anwendung:	Resistenzgen:
Überexpression	<i>HPT</i> für Hygromycinresistenz
Durchgeführte Transformationen:	
N 282, N 405, N 406	
Southern Blot-Restriktionsenzym:	
<i>SacI</i>	



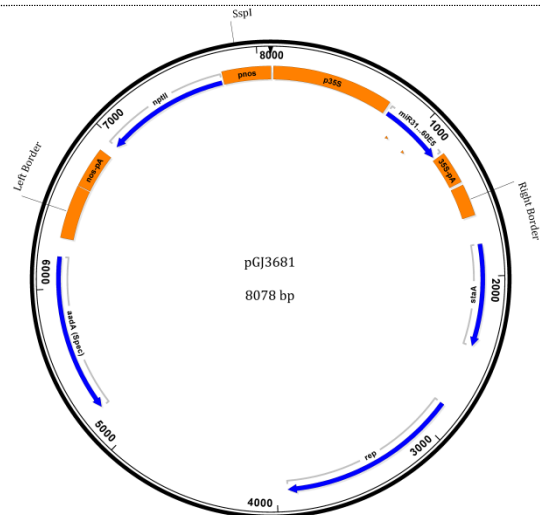
Tab. A9: Ti-Plasmid von A194

Zielgen:	
Potri.007G008600, codonoptimiert	
Anwendung:	Resistenzgen:
Überexpression	<i>NPTII</i> für Kanamycinresistenz
Durchgeführte Transformationen:	
N 311, N 405 (Doppeltransformation mit A185), N 408 (Doppeltransformation mit A201)	
Southern Blot-Restriktionsenzym:	
<i>EcoRI</i>	



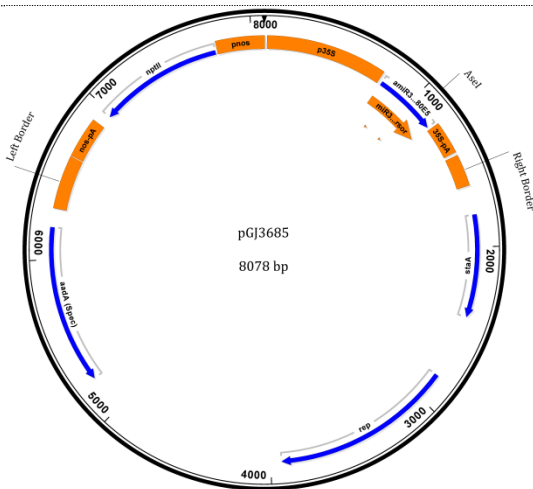
Tab. A10: Ti-Plasmid von A198 und A225

Zielgen:	
Potri.007G008600	
Anwendung:	Resistenzgen:
amiRNA	<i>NPTII</i> für Kanamycinresistenz
Durchgeführte Transformation:	
N 368	
Southern Blot-Restriktionsenzym:	
<i>SspI</i>	



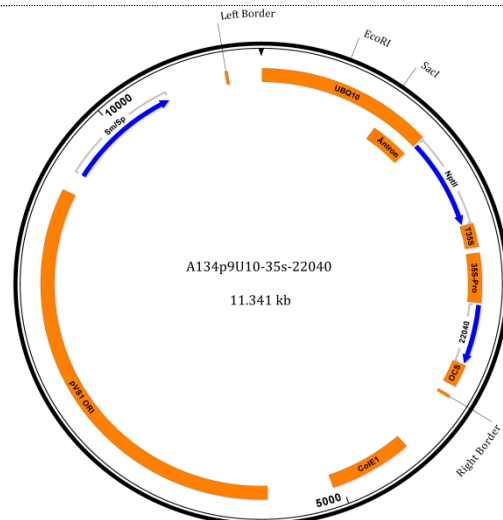
Tab. A11: Ti-Plasmid von A199 und A226

Zielgen:	
Potri.002G034400	
Anwendung:	Resistenzgen:
amiRNA	<i>NPTII</i> für Kanamycinresistenz
Durchgeführte Transformation:	
N 369	
Southern Blot-Restriktionsenzym:	
<i>AseI</i>	



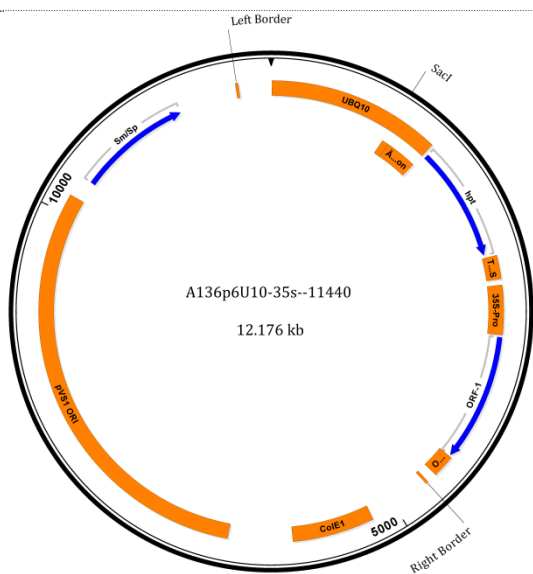
Tab. A12: Ti-Plasmid von A200

Zielgen:	
Potri.002G223100	
Anwendung:	Resistenzgen:
Überexpression	<i>NPTII</i> für Kanamycinresistenz
Durchgeführte Transformationen:	
N 321, N 391, N 406 (Doppeltransformation mit A185)	
Southern Blot-Restriktionsenzyme:	
<i>EcoRI</i> oder <i>SacI</i>	



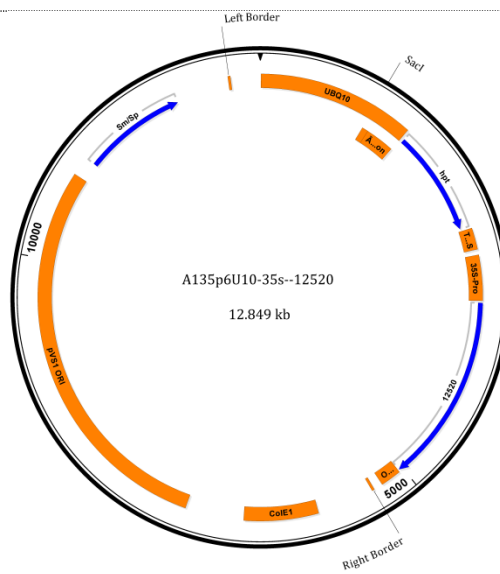
Tab. A13: Ti-Plasmid von A201

Zielgen:	
Potri.019G084600	
Anwendung:	Resistenzgen:
Überexpression	HPT für Hygromycinresistenz
Durchgeführte Transformationen:	
N 322, N 327	
Southern Blot-Restriktionsenzym:	
SacI	



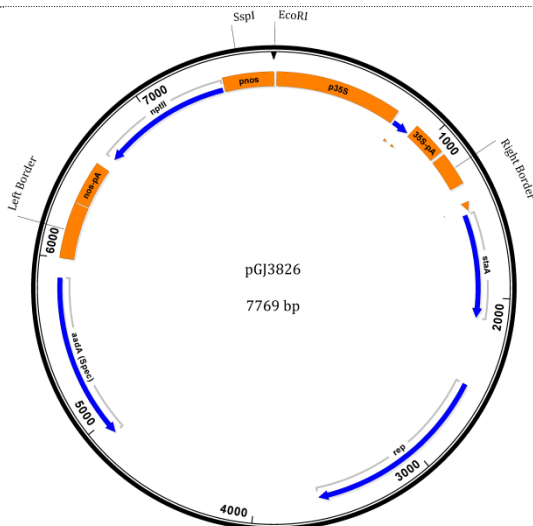
Tab. A14: Ti-Plasmid von A204

Zielgen:	
Potri.005G123800	
Anwendung:	Resistenzgen:
Überexpression	HPT für Hygromycinresistenz
Durchgeführte Transformationen:	
N 329, N 340	
Southern Blot-Restriktionsenzym:	
SacI	



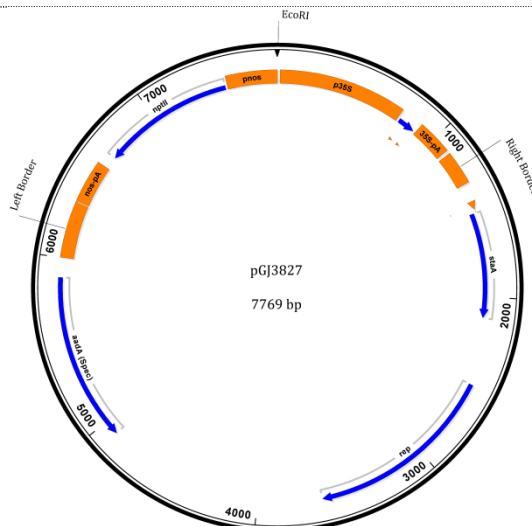
Tab. A15: Ti-Plasmid von A210 und A227

Zielgen:	
Potri.002G034400	
Anwendung:	Resistenzgen:
amiRNA	NPTII für Kanamycinresistenz
Durchgeführte Transformationen:	
N 357, N 393, N 399	
Southern Blot-Restriktionsenzyme:	
SspI oder EcoRI	



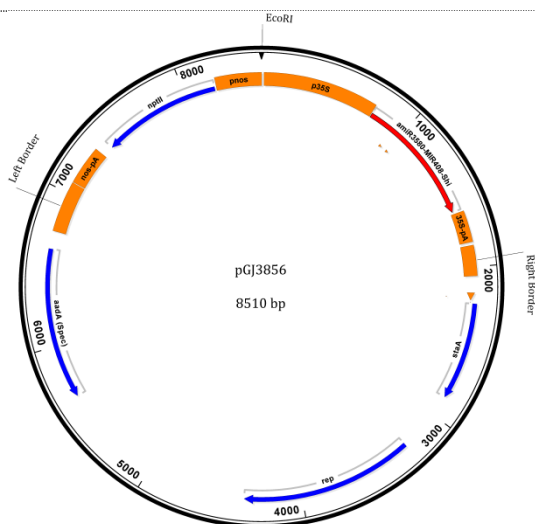
Tab. A16: Ti-Plasmid von A211 und A228

Zielgen:	
Potri.007G008600	
Anwendung:	Resistenzgen:
amiRNA	NPTII für Kanamycinresistenz
Durchgeführte Transformationen:	
N 356, N 371	
Southern Blot-Restriktionsenzym:	
SspI	



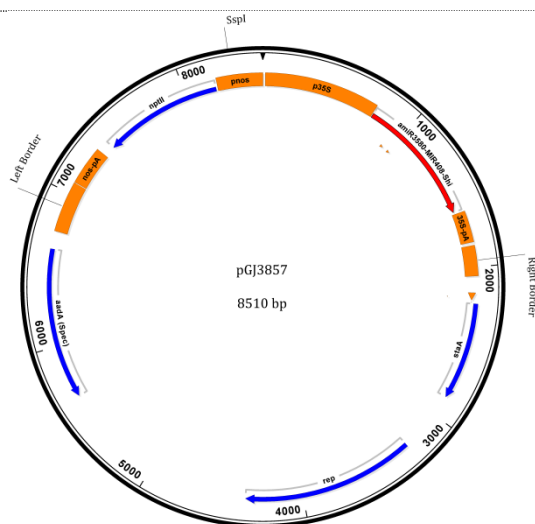
Tab. A17: Ti-Plasmid von A220 und A231

Zielgen:	
Potri.019G084600	
Anwendung:	Resistenzgen:
amiRNA	<i>NPTII</i> für Kanamycinresistenz
Durchgeführte Transformationen:	
N 359, N 374	
Southern Blot-Restriktionsenzym:	
<i>EcoRI</i>	



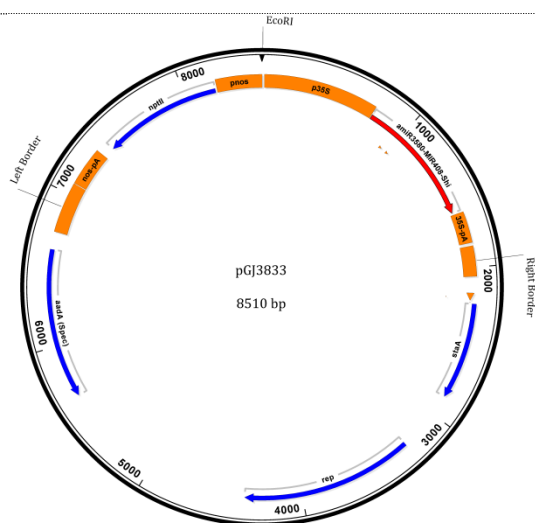
Tab. A18: Ti-Plasmid von A221 und A232

Zielgen:	
Potri.002G223100	
Anwendung:	Resistenzgen:
amiRNA	<i>NPTII</i> für Kanamycinresistenz
Durchgeführte Transformationen:	
N 361, N 375	
Southern Blot-Restriktionsenzym:	
<i>SspI</i>	



Tab. A19: Ti-Plasmid von A229

Zielgen:	
Potri.002G034400	
Anwendung:	Resistenzgen:
amiRNA	<i>NPTII</i> für Kanamycinresistenz
Durchgeführte Transformation:	
N 372	
Southern Blot-Restriktionsenzym:	
<i>EcoRI</i>	



Tab. A20: Ti-Plasmid von A230

Zielgen:	
Potri.007G008600	
Anwendung:	Resistenzgen:
amiRNA	<i>NPTII</i> für Kanamycinresistenz
Durchgeführte Transformation:	
N 373	
Southern Blot-Restriktionsenzym:	
<i>SspI</i>	

