

Molekulare und funktionale Analyse von Lysin-Motiv-
Rezeptor-ähnlichen Kinasen in *P. × canescens*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Biologie der Universität Hamburg

von

Khira Deecke

geboren am

24. August 1988

Hamburg 2021

Gutachter der Dissertation

1. Gutachter: PD Dr. Matthias Fladung
Thünen-Institut für Forstgenetik, Genomforschung

2. Gutachter: Prof. Dr. Julia Kehr
Universität Hamburg, Molekulare Pflanzengenetik

Tag der Disputation: 03. August 2021

I Inhaltsverzeichnis

II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
ZUSAMMENFASSUNG	11
ABSTRACT	12
VERÖFFENTLICHUNGEN	13
1 EINLEITUNG	14
1.1 Der Modellorganismus Pappel.....	14
1.1.1 Kurzumtriebsplantagen in der Energiewende - Energieholz aus Pappeln	15
1.1.2 Einfluss von biotischen Faktoren auf das Wachstum von Pappeln	16
1.2 Erkennung von Pilzen, Bakterien und Viren	19
1.2.1 Lysin-Motiv-Rezeptor-ähnliche Kinasen	20
1.2.2 Symbiose mit mykorrhizierenden Pilzen	22
1.2.3 Symbiose mit stickstofffixierenden Bakterien.....	24
1.2.4 Pathogene biotische Faktoren – <i>Melampsora spec.</i>	25
1.3 Kandidatengene Lysin-Motiv-Rezeptor-ähnliche Kinasen	27
1.4 Genom-Editierung	28
1.4.1 CRISPR/Cas ein Abwehrmechanismus aus Bakterien und Archaeen	29
1.4.2 Klassifizierung der Cas-Proteine	30
1.4.3 CRISPR/Cas9 als natürliches System.....	31
1.4.4 CRISPR/Cas9 als Werkzeug der Molekulargenetik	32
1.4.5 Genom-Editierung bei Bäumen	34
1.5 Zielsetzung der Arbeit	35
2 MATERIAL UND METHODEN	36
2.1 Laborgeräte	36
2.2 Enzyme und Chemikalien.....	37
2.3 Molekularbiologische Kits	37
2.4 Gewebekultur	38
2.4.1 Standard-Medium 460	38
2.4.2 Regenerationsmedium 601	39
2.4.3 Anzucht von Pappelklonen	39
2.4.4 Verwendete Pappelklone	39

I Inhaltsverzeichnis

2.5. Agrobakterien	41
2.5.1 Medien zur Agrobakterienanzucht.....	42
2.5.2 Glycerol-Stocklösungen	42
2.6 Transformationsvektoren	42
2.6.1 CRISPR/Cas9-gRNAs.....	43
2.6.2 Effektivität und OFF-Targets der gRNAs.....	45
2.7. Agrobakterien-vermittelte Transformation von <i>P. × canescens</i>	47
2.7.1 Agrobakterien-Vorkultur	47
2.7.2 Agrobakterien-Hauptkultur	48
2.7.3 Regeneration und Selektion	48
2.8 Isolation von Nukleinsäuren	49
2.8.1 DNA-Isolation aus Blattgewebe von Pappelklonen	50
2.8.2 DNA-Isolation aus mykorrhizierten Pappelwurzeln	51
2.8.3 Isolation von genomischer DNA aus <i>Melampsora spec.</i>	52
2.8.4 Plasmid-Isolation aus Agrobakterienkulturen	53
2.8.5 RNA-Isolation aus Blatt,- Spross- und Wurzelgewebe.....	54
2.8.5.1 RNA-Isolation aus Blattgewebe	54
2.8.5.2 RNA-Isolation aus Wurzelgewebe mittels der CTAB-Methode	54
2.8.5.3 RNA-Isolation aus verschiedenen Pflanzengeweben	55
2.8.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	57
2.9 Analyse von Nukleinsäuren	58
2.9.1 Oligonukleotide	58
2.9.2 Polymerase-Ketten-Reaktion	58
2.9.3 Agarose-Gelelektrophorese	59
2.9.4 Aufreinigung von PCR-Fragmenten	60
2.9.5 Herstellung von Digoxigenin-markierten Sonden	60
2.9.6 Southern-Blot	61
2.9.7 Thermal Asymmetric Interlaced (TAIL)-PCR	67
2.9.8 Sanger-Sequenzierung.....	69
2.10 Expressionsanalysen.....	71
2.10.1 Qualitätsnachweis der RNA.....	71
2.10.2 cDNA-Synthese	72
2.10.3 Real-Time PCR	73
2.11 Versuche mit <i>Melampsora spec.</i>.....	77
2.11.1 Kultivierung von Sporenmaterial.....	77
2.11.2 Infektionsversuche mit <i>Melampsora spec.</i>	77
2.12. Untersuchung von Pappelklonen im Gewächshaus	80

I Inhaltsverzeichnis

2.12.1 Überführung von Pflanzen der Gewebekultur in die Erdkultur	80
2.12.2 Mykorrhizierungsversuche im Gewächshaus.....	82
2.13 Mikroskopische Techniken	84
2.14 Computergestützte Analyse und Auswertung.....	84
2.14.1 Statistische Auswertung.....	85
3 ERGEBNISSE	86
3.1 In silico-Auswahl Chitin-bindender Kandidatengene in der Gattung <i>Populus</i>.....	86
3.1.1 Übertragbarkeit der <i>NFP-like</i> Kandidatengene auf <i>Populus</i>	87
3.1.2 Kandidatengen <i>NFP-like2</i> ist in <i>P. × canescens</i> nicht vorhanden	87
3.2 Expressionsanalyse der <i>NFP-like</i> Kandidatengene	90
3.2.1 <i>In silico</i> -Analyse in verschiedenen <i>Populus</i> Arten	90
3.2.2 Quantitative Analyse der Expression von <i>NFP-like</i> in <i>P. × canescens</i>	92
3.3 CRISPR/Cas9-Modifikation von <i>NFP-like1</i> in <i>P. × canescens</i>.....	94
3.3.1 Modifikationen von <i>NFP-like1</i>	94
3.3.2 Doppelmodifikation von <i>NFP-like3</i> und <i>NFP-like4</i>	106
3.3.3 Dreifachmodifikation von <i>NFP-like1</i> , <i>NFP-like3</i> und <i>NFP-like4</i>	122
3.3.4 Nachweis der Integrationsorte.....	132
3.3.5 Analyse der CRISPR/Cas9 Modifikation in Abhängigkeit von der Zeit.....	135
3.3.6 OFF-Target-Analyse	136
3.4 In silico-Vorhersage der Proteinstruktur	138
3.4.1 Modifikation von <i>NFP-like1</i>	138
3.4.2 Doppelmodifikation von <i>NFP-like3</i> und <i>NFP-like4</i>	140
3.4.3 Dreifachmodifikation von <i>NFP-like1</i> , <i>NFP-like3</i> und <i>NFP-like4</i>	145
3.5 Mykorrhizierungsversuche	149
3.5.1. Analyse des Mykorrhizierungsverhaltens in <i>NFP-like</i> modifizierten Pappelinien	149
3.5.2 Phänotypische Analyse.....	149
3.5.3 Mikroskopische Analyse von Wurzelspitzen	151
3.5.4 Molekulare Untersuchungen von Wurzelmaterial	152
3.6 Infektion von Pappeln mit <i>Melampsora spec.</i>	155
3.6.1 Gewinnung von geeigneten <i>Melampsora spec.</i> für Infektionsversuche	155
3.6.2 Infektionstest verschiedener Pappelklone	156
3.6.3 Testung der Anfälligkeit von <i>NFP-like</i> modifizierten Pappelinien	168
4 DISKUSSION.....	171
4.1 Fragestellungen des Forschungsvorhabens.....	171

I Inhaltsverzeichnis

4.2 Kandidatengen <i>NFP-like2</i> in <i>P. × canescens</i>	173
4.3. Vergleich der Expression von <i>NFP-like</i> Genen in verschiedenen Pappelklonen.....	174
4.4 CRISPR/Cas9-vermittelte genetische Modifikation von <i>NFP-like</i> Genen	176
4.4.1 Effizienz der gewählten gRNAs.....	177
4.4.2 Modifikation von <i>NFP-like</i> Kandidatengenen.....	179
4.4.3 Modifikationsunterschiede auf genomischer und transkriptioneller Ebene	186
4.4.4 Proteinvorhersage.....	187
4.4.5 Modifikationsveränderung über die Zeit.....	190
4.4.6 OFF-Target-Analyse	192
4.5 Mykorrhizierungsverhalten von <i>NFP-like</i> modifizierten Pappeln	194
4.6 Infektionsversuche mit <i>Melampsora spec.</i>	199
4.6.1 Vergleich der Befallssymptome verwendeter <i>Melampsora</i>	199
4.6.2 Resistenzveränderung in <i>NFP-like</i> modifizierten Pappeln.....	201
4.7 Ausblick.....	204
5. LITERATURVERZEICHNIS.....	206
6 ANHANG.....	221
DANKSAGUNG	260
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	261

II Abkürzungsverzeichnis

Chemikalien und Lösungen:

ATMAB	Alkyltrimethylammoniumbromid
CSPD	Disodium 3-(4-Methoxyspiro [1,2-Dioxetan-3,2-(5-Chloro)tricyclodecan]-4-yl) Phenylphosphat
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HPCL-H ₂ O	Wasser für die Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
LB	Luria-Bertani-Medium
PVP	Polyvinylpyrrolidon
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Engl. <i>sodium/sodium citrate</i> , Natriumchlorid/Trinatriumcitrat
SSTE	Natriumdodecylsulfat-Tris-HCl-EDTA
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
YEB	Engl. <i>Yeast Extract Broth</i> , Hefeextrakt mit Pepton und Fleischextrakt
YEP	Engl. <i>Yeast Extract Peptone</i> , Hefeextrakt mit Pepton

Molekularbiologische Abkürzungen:

A	Adenin
AM	Arbuskuläre Mykorrhizierung
Amp.	Ampicillin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
C	Cytosin
Cas	Engl. <i>CRISPR-associated</i> , CRISPR-assoziiert
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cds	Engl. <i>coding sequence</i> , kodierende Sequenz
Cef	Cefotaxim
CRISPR	Engl. <i>clustered regular interspaced short palindromic repeats</i> , gehäuft auftretende, regelmäßig unterbrochene, kurze palindromische Wiederholungen
crRNA	CRISPR-RNA

II Abkürzungsverzeichnis

ct	Engl. <i>cycle threshold</i> , Zyklus-Schwellenwert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleintriphosphat
dpi	Engl. <i>day post inoculation</i> , Tag nach Inokulation
EM	Ektomykorrhizierung
ETI	Engl. <i>EffectorTriggered Immunity</i> , Effektor vermittelte Immunität
for	Engl. <i>forward</i> , vorwärts
G	Guanin
gDNA	Genomische Desoxyribonukleinsäure
Gent	Gentamycin
gRNA	GuideRNA
hph	Hygromycin B Phosphotransferase
Kan	Kanamycin
Knockout	Ausschalten eines Gens
LRR	Engl. <i>Leucin Rich Repeat</i> , Leucin-reiche Wiederholung
LysM	Lysin-Motiv
LysM-RLK	Lysin-Motiv-Rezeptor-ähnliche Kinase
MAMP	Engl. <i>Microbe-associated molecular pattern</i> , Mikrobe-assoziierte molekulare Strukturen
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
Myc-LCO	Mykorrhiza-Lipochitooligosaccharide
NFP	Engl. <i>Nodulin-Perception-Factor</i> , Nodulin-erkennender Faktor
NHEJ	Engl. <i>Non-homologous end joining</i> , nicht homologe Endverbindung
NMD	Engl. <i>Non-sense mediated mRNA decay</i> , Stopcodon-vermittelter Abbau der mRNA
<i>nptII</i>	Neomycin-Phosphotransferase
nt	Nukleotid
ODM	Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese
P.	<i>Populus</i>
PAM	Engl. <i>proto-spacer adjacent motif</i> , Vorabstandshalter-angrenzende Sequenz
PAMP	Engl. <i>pathogen-associated molecular pattern</i> , Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen
PCR	Engl. <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
PTI	Engl. <i>PAMP Triggered Immunity</i> , PAMP-vermittelte Immunität
rev	Engl. <i>reverse</i> , rückwärts
RLK	Engl. <i>Receptor-Like Kinase</i> , Rezeptor-ähnliche Kinase
RLP	Engl. <i>Receptor-Like Protein</i> , Rezeptor-ähnliches Protein

II Abkürzungsverzeichnis

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	Reverse Transkription PCR
SNP	Engl. <i>Single Nucleotid Polymorphism</i> , Einzelnukleotid-Polymorphismus
Spec	Spectinomycin
spec	Spezies, Art
Spp.	Spezies (Plural)
T	Thymin
TALEN	Engl. <i>Transcription Activator-Like Effector Nuclease</i> , Transkription-aktivierende ähnliche Effektor Nuklease
Target	Ziel,
Tet	Tetracyclin
tracrRNA	Engl. <i>trans-activation crRNA</i> , transaktivierende crRNA
t-RNA	transfer-RNA
Upstream	strangaufwärts
UTR	Engl. <i>untranslated region</i> , nicht translatierter Bereich

Einheiten und weitere Abkürzungen:

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
ad.	Auffüllen auf
ca.	Circa
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DCS	DNA Cloning Service e.K. Hamburg, Deutschland
<i>et al.</i>	und Mitarbeiter
G	Beschleunigungskraft
g	Gramm
h	Stunde
ha	Hektar
Kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
KUPs	Kurzumtriebsplantagen
L	Liter
M	Molar
m	Meter

Mg	Megagramm
min	Minute
mJ	Millijoule
mL	Milliliter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
rpm	Engl. <i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
U	Engl. <i>unit</i> , Einheit
üN	Über Nacht
Vol.	Volumen
y	Engl. <i>year</i> , Jahr
z.B.	Zum Beispiel
V	Volt
lg(x)	Dekadischer Logarithmus

Zusammenfassung

Zur Gewinnung von Bioenergie werden Pappeln als Energieholz auf Kurzumtriebsplantagen (KUPs) angebaut. Während der Wachstumsphase sind die Pappeln biotischen und abiotischen Umwelteinflüssen ausgesetzt. Eine Reduktion der Biomasse kann bei schadhafte Umwelteinflüssen wie Pilzbefall oder Trockenstress die Folge sein. Ertragseinbußen von bis zu 50 % können durch den biotrophen Pilz *Melampsora spec.* verursacht werden. Andere biotische Einflüsse, wie beispielsweise mykorrhizierende Pilze, können einen positiven Effekt auf das Pflanzenwachstum, insbesondere in Stresssituationen haben.

Die pflanzliche Immunantwort wird über *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) nach Erkennung von pilzlichem Chitin über Lysin-Motiv-Rezeptor-ähnliche Kinasen (LysM-RLKs) vermittelt. Insgesamt 19 LysM-RLKs wurden in der Pappel annotiert, von denen vier für *Nod-Factor Perception*“ (*NFP*)-ähnliche Gene kodieren, die mutmaßlich an der Ausbildung einer Symbiose mit mykorrhizierenden Pilzen involviert sind. Die orthologen Gene zu den gewählten *NFP-like*-Kandidatengenen in Pappel sind in *Medicago truncatula* und *Lotus japonicus* an der Ausbildung einer Symbiose mit Knöllchenbakterien beteiligt.

Auf Grund der Genomduplikation der Pappel liegen die *NFP-like*-Kandidatengene in paralogen Paaren vor. *In silico*- und Real-Time PCR-Analysen zeigten, dass das Kandidatengene *NFP-like2* in dem verwendeten *P. × canescens*-Klon nicht vorhanden ist. Anhand von Expressionsanalysen konnte bestätigt werden, dass *NFP-like3* und *NFP-like4* eine wurzellozierte Funktion aufweisen. Jedoch konnte eine Expression dieser Kandidatengene auch in Blattgewebe nachgewiesen werden. Die Analysen ergaben, dass *NFP-like1* in den untersuchten Geweben so gering exprimiert ist, dass ihm mutmaßlich keine Funktion zukommt.

Zur Modifikation der *NFP-like*-Kandidatengene wurden CRISPR/Cas9-Konstrukte erzeugt, die in beiden Genen eines paralogen Paares eine Modifikation hervorrufen können. Es konnten transgene Linien erzeugt werden, die eine Einzelmodifikation, Doppelmodifikationen und Dreifachmodifikationen in den Kandidatengenen aufwiesen. Molekulargenetische Analysen der generierten transgenen Linien wurden genutzt, um Kandidatenlinien für Mykorrhizierungs- und Infektionsversuche mit *Melampsora spec.* auszuwählen. Die Kandidatenlinien zeigten im durchgeführten Mykorrhizierungsversuch kein verändertes Mykorrhizierungsverhalten. Allerdings konnte für einzelne transgene Linien eine gesteigerte Resistenz gegenüber *Melampsora spec.* beobachtet werden.

Abstract

To produce bioenergy, poplar is grown on short rotation coppices (SRC). During the growth period, plants are exposed to biotic and abiotic environmental influences. A reduction in biomass can result from environmental factors such as fungal attack or drought. Yield losses of up to 50 % can be caused by the biotrophic rust fungi *Melampsora* spp. Other biotic influences such as mycorrhizal fungi can have positive effects on plant growth, especially during stress situations.

Plant immune response is triggered by “pathogen associated molecular pattern” (PAMP) after detection of fungal chitin via Lysin-motif receptor-like kinases (LysM-RLK’s). Overall, a total of nineteen LysM-RLK’s were found in poplar, four of which encode for *Nod factor perception (NFP)*-like genes that are thought to have an impact on mycorrhization. The orthologous genes of the poplar *NFP-like* genes are essential for promoting mycorrhization with bacteria in *Medicago truncatula* und *Lotus japonicus*.

Due to the duplication of the poplar genome, the *NFP-like* candidate genes are present in two paralog pairs. *In silico* and RT-PCR analysis showed that the candidate gene *NFP-like2* is not present in the used *P. × canescens* clone. Expression analysis of all genes revealed that *NFP-like3* and *NFP-like4* have a root associated function. In addition, an expression of *NFP-like3* and *NFP-like4* was detected in leaf tissue. The slight expression level of *NFP-like1* indicates that it is not functional in the analysed tissues.

CRISPR/Cas9 constructs were created to modify *NFP-like* candidate genes in both genes of a paralog pair. Transgenic lines were generated that exhibited single modifications, double modification and triple modification. Molecular analyses of the generated transgene lines were used to screen for candidate lines to perform mycorrhization and *Melampsora* infection assays. In the mycorrhization assay conducted, there was no evidence of an altered mycorrhization potential of the analysed lines corresponding to the wildtype. Enhanced resistance was observed for separate transgene lines performing the *Melampsora* infection assay.

Veröffentlichungen

Im folgenden werden die aus dieser Dissertation hervorgegangenen Veröffentlichungen angegeben:

Bruegmann, T., Deecke, K., und Fladung, M. (2019). Evaluating the efficiency of gRNAs in CRISPR/Cas9 mediated genome editing in poplars. *Int J Mol Sci* 20(15): 3623.

Deecke, K. und Fladung, M. (2021). *Melampsora* Resistenztests in Pappeln, AFZ Wald 76(4): 26-29.

1 Einleitung

1.1 Der Modellorganismus Pappel

Die Gattung *Populus* gehört der Familie der *Salicaceae* und der Ordnung der *Malpighaceae* an (Cronk, 2005), dabei besteht die Familie der *Salicaceae* aus zahlreichen meist tropischen Gattungen. Weiterhin zeichnet sich die Gattung *Populus* durch ihre weite Verbreitung in der nördlichen Hemisphäre (DiFazio *et al.*, 2011) und bei optimalen Standortbedingungen durch hohe relative Wachstumsraten und rapide Biomasseerzeugung aus (Bradshaw *et al.*, 2000; Cronk, 2005). Bei intensiver Kultur in Kurzumtriebsplantagen können Hybridpappeln eine Trockenbiomasse von 17–30 Mg/ha/y erzielen (Zsuffa *et al.*, 1996). Die meisten Pappeln blühen erst nach einer Wachstumsphase von vier Jahren, manche hingegen erst nach einer Zeitspanne von acht Jahren (Bradshaw *et al.*, 2000). Die Vermehrung der diözischen Pappeln kann neben der Windbestäubung (Bradshaw *et al.*, 2000) auch über die vegetative Vermehrung über Sprosse erfolgen (Cronk, 2005).

Die Gattung *Populus* wurde von Eckenwalder (1996) in 6 Sektionen eingeteilt: *Abaso*, *Aigeiros*, *Leuroides*, *Populus* (früher *Leuce*), *Tacamahaca* und *Turanga*. Nach Eckenwalder (1996) gliedern sich in den genannten Sektionen 29 *Populus*-Arten, allerdings sind für die chinesische Pflanzenwelt mehr als 60 Arten beschrieben (Wu, 1999). Die Differenz in der Artzahl verschiedener Arbeitsgruppen ist auf eine unterschiedliche Interpretation des Begriffs „Art“ zurückzuführen, da Hybride häufig als eigene Arten angesehen werden (Eckenwalder, 1996). Kreuzungen innerhalb von Sektionen sind möglich (Bradshaw *et al.*, 2000) und können einen für die Pappelzüchtung vorteilhaften Heterosisseffekt erzeugen (Zsuffa *et al.*, 1996). Manchmal sind auch intersektionelle Kreuzungen zwischen Arten verschiedener Sektionen möglich, wie z. B. Arten der Sektion *Aigeiros* mit Arten von *Leuroides* und *Tacamahaca* (Willing und Pryor, 1976). Eine Kreuzungskompatibilität zwischen Arten der Sektionen *Leuroides* und *Tacamahaca* ist vermutlich ebenfalls vorhanden (Willing und Pryor, 1976). Intersektionelle Hybride zwischen den Sektionen *Populus* und *Turanga* konnten bisher unter natürlichen Bedingungen nicht beobachtet werden (Willing und Pryor, 1976).

Das Genom der Pappel (*Populus*) besteht aus ungefähr 35.000 Genen, die sich auf 19 Chromosomen des diploiden Organismus ($2n = 38$ Chromosomen) verteilen (Cronk, 2005). Als erste Baumart überhaupt wurde bereits 2006 *Populus trichocarpa* Torr. & Gray vollständig sequenziert (Tuskan *et al.*, 2006, <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). Genominformationen für weitere Pappelarten wie *P. tremula*, *P. tremuloides* (<https://popgenie.org/>) und den Pappelklon INRA 717-1B4, eine *P. × canescens*

1 Einleitung

(*P. tremula* × *P. alba*) sind vorhanden (<http://aspendb.uga.edu>; <https://urgi.versailles.inra.fr/Species/Forest-trees/Populus/Clone-INRA-717-1B4/>) und stehen ebenso digital zur Verfügung. Das haploide Genom der Pappel ist lediglich viermal größer als das der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (Bradshaw *et al.*, 2000). Durch das kleine Genom der Pappel werden molekulargenetische Techniken möglich (Bradshaw *et al.*, 2000) und genetische Modifikationen mittels Agrobakterien lassen sich insbesondere an Hybridpappeln durchführen (Jouanin *et al.*, 1993). Als einer der ersten Bäume wurde die Transformation von Pappeln bereits 1987 (Fillatti *et al.*, 1987) durchgeführt und Pappeln seitdem häufiger erfolgreich transformiert als alle anderen Baumarten zusammen (Peña und Séguin, 2001).

1.1.1 Kurzumtriebsplantagen in der Energiewende - Energieholz aus Pappeln

Nach der Reaktorkatastrophe in Fukushima (Japan) beschloss die deutsche Regierung am 06. Juni 2011 den Ausstieg aus der Atomkraft und gleichzeitig eine Förderung erneuerbarer Energien (<https://www.lpb-bw.de/energiewende>, 27.08.2020). Neben dem Verzicht auf nukleare Energien sollte der Umstieg von fossilen Energieträgern (Kohle, Erdöl und Erdgas) zu erneuerbaren Energien (Windenergie, Wasserkraft, Biomasse und Sonnenenergie) erfolgen (<https://www.lpb-bw.de/energiewende>, 27.08.2020). Ziel war es zunächst, bis 2020 einen Anstieg der Energie aus erneuerbaren Energien auf mindestens 20 % zu erreichen. Insgesamt konnte bis 2019 ein Anteil von 17,1 % erzielt werden (<https://www.umweltbundesamt.de/themen/klima-energie/erneuerbare-energien/erneuerbare-energien-in-zahlen#statusquo>, 27.08.2020). Die aus Holz gewonnene Biomasse nahm mit 116 Terawattstunden für das Jahr 2019 den größten Anteil der erneuerbaren Wärmeerzeugung ein (<https://www.umweltbundesamt.de/themen/klima-energie/erneuerbare-energien/erneuerbare-energien-in-zahlen#statusquo>, 27.08.2020). Bioenergetische Getreide können für die Energiegeneration (Elektrizität, Hitze und Energie) sowie als fossile Transportbrennstoffe verwendet werden (Karp und Shield, 2008). Zur Gewinnung erneuerbarer Energien aus Pflanzen dienen sowohl Getreidesamen und Zuckersaaten wie Weizen, Mais und Zuckerrohr, mehrjährige Gräser wie Rutenhirse und Chinaschilf sowie schnellwachsende Baumarten wie Pappeln und Weiden (Karp und Shield, 2008). Die Pappeln und Weiden haben die höchsten CO₂-Austauschraten, Lichtverwendungseffizienzen und Photosynthesekapazitäten der holzigen Arten (Karp und Shield, 2008). Zur Gewinnung von Biomasse, Futtermitteln, Schnittholz und Holzbrennstoffen (Dickmann, 2006) werden unter anderem Pappeln und Schwarzpappeln auf Kurzumtriebsplantagen

1 Einleitung

(KUPs) angebaut, da sie nicht mit Pflanzen zur Nahrungsgewinnung konkurrieren (Bruegmann und Fladung, 2013). Auf diesen KUPs werden Pappeln und Weiden für 15–18 Jahre kultiviert und in regelmäßigen Abständen von 3–5 Jahren heruntergeschnitten, sodass ein erneutes Austreiben erfolgt (Karp und Shield, 2008).

Samen der amerikanischen *Populus deltoides* wurden nach Europa eingebracht, durch Kreuzung der amerikanischen *Populus deltoides* mit den heimischen *Populus nigra* entstanden interkontinentale Hybride (Dickmann, 2006). Die resultierenden Hybridpappeln (*P. × canadensis* Moench) wurden erstmals 1755 beschrieben und zeigten Heterosiseffekte in Höhen- und Durchmesserwachstum (Dickmann, 2006). *P. × canadensis* waren die ersten Hybridpappeln, die in KUPs angebaut wurden (Dickmann, 2006). Je nach Verwendung und Standortbeschaffenheit sollten unterschiedliche Klone/Arten angebaut werden, um einen maximalen Ertrag zu erzielen (Krauter *et al.*, 2003). Vorrangig sollten die Klone der Sektionen *Populus* (*P. tremula*, *P. tremuloides* und *P. grandidentata*) für längere Kurzumtriebszeiten von 10–12 Jahren verwendet werden, außerdem eignen sich die genannten Klone für nährstoffarme Böden und weniger gute klimatische Bedingungen (Kauter *et al.*, 2003). Im traditionellen System mit Kurzumtrieben von 3–5 Jahren werden die Klone der Sektion *Aigeiros* (*P. nigra*, *P. deltoides* und *P. angulata*) und *Tacamahaca* (*P. maximowiczii*, *P. trichocarpa* und *P. balsamifera*) sowie deren Hybride empfohlen (Kauter *et al.*, 2003).

Nach der Pflanzung geeigneter Pappelklone in Bezug auf das Verwertungsziel und die Bodenbeschaffenheit, müssen die Pappeln lediglich in den ersten zwei Jahren gegenüber Unkräutern geschützt werden, bis sie ein ausreichendes Wachstum erreicht haben (Becker *et al.*, 2014).

Die Ernte der Pappeln in Kurzumtriebsplantagen erfolgt zum Winter, da einerseits ein erneutes Austreiben verbessert wird und andererseits die Nährstoffe aus den Blättern in der holzigen Biomasse zwischengespeichert werden, was dementsprechend die Brennstoffqualität positiv beeinflusst (Kauter *et al.*, 2003).

1.1.2 Einfluss von biotischen Faktoren auf das Wachstum von Pappeln

Pappeln sind wie alle Pflanzen allgemein auf Grund ihrer Standortgebundenheit diversen äußerlichen Einflüssen ausgesetzt. Neben abiotischen Einflüssen wie beispielsweise Sonnenlicht, Temperatur, Wasserverfügbarkeit und Nährstoffgehalt des Bodens, haben auch biotische Faktoren einen Effekt auf das pflanzliche Wachstum und den Ertrag. Zu den biotischen Faktoren, die auf das Wachstum der Pappel wirken, zählen Viren, Bakterien, Säugetiere, Insekten und Pilze (Becker *et al.*, 2014). Dabei wirken oftmals sowohl biotische

1 Einleitung

als auch abiotische Faktoren zusammen und bewirken eine Ertragsreduktion (Pandey *et al.*, 2017). Abiotische Faktoren wie Trockenheit, hohe und niedrige Temperaturen sowie Salzgehalte im Boden erhöhen das Vorkommen von Pathogenen, Insekten und Unkräutern (Pandey *et al.*, 2017). Durch den Klimawandel erfahren Pappeln wie auch andere Pflanzen immer stärkere Extreme wie Hitze und Dürreperioden, die sie dementsprechend anfälliger gegenüber Pathogenen machen. Schädlinge, die für die Pappel unter stressfreien Bedingungen keinen verehrenden Effekt aufweisen, können zu einer potentiellen Bedrohung werden (Pandey *et al.*, 2017).

Bei Dürre ist die Konkurrenz zwischen der Nutzpflanze und Unkräutern um die Wasserverfügbarkeit erhöht (Pandey *et al.*, 2017), zusätzlich zu der bereits vorherrschenden Konkurrenz zwischen Pappeln und Unkräutern. Beispielsweise entziehen die Unkräuter Nährstoffe aus dem Boden oder es entsteht eine Konkurrenz um Licht, sodass eine Auswirkung auf die Biomasse der Pappel die Folge sein kann. Einen weiteren Einfluss auf das pflanzliche Wachstum haben Fraßschäden von Tieren und Insekten, die durch die Verletzung des Gewebes einerseits Eintrittsstellen für Viren und Bakterien erzeugen, aber andererseits auch die zur Photosynthese nötigen Blätter schädigen. Insekten dienen als Vektoren für Viren (Trębicki *et al.*, 2017). Die Infektion mit Viren kann dazu führen, dass das pflanzliche Volatilprofil dahingehend verändert wird, dass sie für die übertragenden Schadinsekten ansprechender sind (Trębicki *et al.*, 2017).

Pflanzliche Pathogene sind meistens Mikroorganismen wie Bakterien, Viren, Pilze, Nematoden und Protozoen sowie einige parasitischen Pflanzen und Algen (Agrios, 2009). Bei einem Befall mit Pathogenen werden der Pflanze Nährstoffe entzogen, die vom Pathogen für das eigene Wachstum, Reproduktion und Vermehrung verwendet werden (Agrios, 2009). Die Pathogene erzeugen unterschiedliche Schadsymptome, die von nicht-signifikant bis hin zu tödlich für die Nutzpflanze variieren können (Agrios, 2009). Durch die Invasion eines Pathogens wird die Integrität und der Metabolismus der Wirtspflanze durch vom Pathogen erzeugte Enzyme und Toxine gestört (Agrios, 2009).

Die meisten pflanzlichen Pathogene sind Pilze (Agrios, 2009), zu den verheerenden Pappelpathogenen gehört der Pilz *Melampsora spec.* (Unterabschnitt 1.2.4), der Ertragseinbußen von bis zu 50 % bedingen kann (Dowkiw *et al.*, 2003). Weitere pilzliche Pappelblattpathogene sind *Venturia spec.*, *Septoria spec.*, *Marssonina spec.*, *Apioplagiostoma populi* und *Taphrina spec.* (Duplessis *et al.*, 2009). Zu den pilzlichen Stielpathogenen der Pappel zählen *Entoleuca mammata*, *Phellinus tremulae*, *Cytospora chrysosperma*, *Dicosporium populeum* und *Phellinus tremulae* (Duplessis *et al.*,

1 Einleitung

2009). Pappeln werden nicht nur von pilzlichen Pathogenen befallen, sondern auch von bakteriellen Pathogenen, ein Stielkrebs verursachendes, bakterielles Pappelpathogen ist *Xanthomonas populi* (Duplessis *et al.*, 2009). Weiterhin sind Pappeln, wie Pflanzen im Allgemeinen, anfällig gegenüber Viren. Mehr als 2000 Viren führen zu Pflanzenkrankheiten, dabei gehören sie zu den einfachsten und kleinsten Pathogenen (Agrios, 2009). Als Beispiel eines viralen Pappelpathogens ist das Pappelmosaik Virus zu nennen (Duplessis *et al.*, 2009). Weitere mögliche Pathogene bilden Nematoden; diese verletzen hauptsächlich die Wurzeln ihrer Wirtspflanzen und haben Wurzelgallen, extensive Wurzelverzweigung, ein gehemmtes Wurzelwachstum bis hin zu Verformung der oberirdischen Pflanzenorgane oder den Tod der Pflanze zur Folge (Agrios, 2009). Baldacci-Cresp *et al.* (2016) zeigten, dass *in vitro* Pappeln (*P. tremula* × *P. alba*) anfällig gegenüber dem Nematoden *Meloidogyne incognita* sind.

Pilzliche Organismen können neben Pathogenen auch Symbiosepartner für Pflanzen sein. Symbiontische Wurzelpilze (Mykorrhiza) können die Nährstoffaufnahme und somit das Wachstum und die Vitalität der Nutzpflanze beeinflussen. Beispielsweise zeigten Liu *et al.* (2015), dass mykorrhizierte Pappeln unter Trockenstress gut wuchsen und spekulierten, dass symbiontische Wurzelpilze (Mykorrhizen) die Pappel zu einer effizienteren Wasseraufnahme unter Trockenstress anregen. Durch den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln können Schaderreger der Pappeln verringert werden, um den Ertrag zu steigern. Der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln gegen tierische und pilzliche Schädlinge in KUPs mit schnellwachsenden Baumarten wird aber nur auf Antrag zugelassen (Becker *et al.*, 2014), sodass andere Strategien gegen Schädlinge nötig sind.

Pappeln verfügen über ein Abwehrsystem, um den Befall von Pathogenen zu verhindern oder abzuschwächen. Über spezielle Rezeptoren können Pflanzen Pathogene erkennen. Neben schädlichen Organismen existieren unter anderem Pilze, die mit ihrer Wirtspflanze eine symbiontische Beziehung zum gegenseitigen Nährstoffaustausch eingehen können. Die sich auf das Wachstum positiv auswirkenden Pilze werden über strukturell ähnliche Rezeptoren erkannt, wie die pathogenen Organismen. Die Funktion einiger Gene, die strukturell ähnliche Rezeptoren ausbilden, die die Ausbildung einer Resistenz oder Anfälligkeit gegenüber schädlichen Pilzen oder die Ausbildung einer Symbiose vermitteln, ist Bestandteil der vorliegenden Arbeit. Im Folgenden wird daher näher auf die Erkennung schädlicher Pilzorganismen sowie die Ausbildung der Symbiose mit Wurzelbakterien und -pilzen eingegangen.

1.2 Erkennung von Pilzen, Bakterien und Viren

Pflanzen sind ebenso wie andere Lebewesen anfällig gegenüber Krankheiten, die von Bakterien, Pilzen und Viren verursacht werden. Weiterhin wird das Wachstum der Pflanzen von Fraßfeinden beeinflusst. Über Rezeptoren können Pflanzen zwischen „sich selbst“ und „fremdartig“ unterscheiden, sodass eine Infektion mit Pathogenen vorgebeugt oder verhindert werden kann (Desaki *et al.*, 2018).

Wurde eine Pflanze durch Fraß geschädigt, kann sie auf unterschiedliche Weise reagieren (Kessler und Baldwin, 2002). Bei geringem Fraß kann beispielsweise keine Reaktion erfolgen, da die Pflanze den Blattverlust oder die Verletzung tolerieren kann (Kessler und Baldwin, 2002). Eine weitere Möglichkeit der Pflanze als Reaktion auf einen Fraß, der nicht tolerierbar ist oder zu weiteren großen Schäden führt, sind die direkte oder indirekte Abwehr (Kessler und Baldwin, 2002). Die direkte Abwehr bezieht Dornen, Trichome sowie primäre und sekundäre Stoffwechselprodukte ein (Kessler und Baldwin, 2002). Weiterhin werden Proteaseinhibitoren bei Verwundung und Fraß induziert, die den Zersetzungszyklus der Fraßfeinde inhibieren. Durch Polyphenoloxidasen wird der Nährstoffgehalt der verwundeten Pflanze reduziert, sodass sie für Fraßfeinde unattraktiv wird (Kessler und Baldwin, 2002). Außerdem werden toxische Stoffe wie Alkaloide, Terpene oder Phenole produziert (Kessler und Baldwin, 2002). Bei der indirekten Abwehr produziert die Pflanze flüchtige organische Stoffe, um Feinde ihrer Fraßfeinde anzulocken, um weiteren Fraß zu verhindern (Kessler und Baldwin, 2002).

Pathogene Pilze und Bakterien haben unterschiedliche Strategien entwickelt, um in das pflanzliche Gewebe zu gelangen. Pathogene Bakterien können über Wundstellen, Stomata oder Wasserporen in den Apoplasten gelangen (Jones und Dangl, 2006). Pathogene oder symbiontische Pilze können Haustorien im pflanzlichen Gewebe ausbilden, um ein Stoffaustausch mit der Pflanze zu gewährleisten (Jones und Dangl, 2006).

Um sich gegen die Invasion mit Pathogenen zu schützen, besitzt die Pflanze zwei verschiedene Möglichkeiten, um auf eine Infektion zu reagieren. Einerseits kann die Abwehr über die sogenannte PTI (*PAMP Triggered Immunity*) erfolgen (Boller und Felix, 2009). Dabei werden die pilzlichen PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) oder bakteriellen MAMPs (*microbe associated molecular patterns*) über extrazelluläre Rezeptoren erkannt (Boller und Felix, 2009). PAMPs und MAMPs, die der Pflanze zur Erkennung von Fremdorganismen dienen, sind Kohlenhydrate wie Chitin, Chitosan, Peptidoglycan, β -Glucan, Mannan und Lipopolysaccharide (Desaki *et al.*, 2018). Weiterhin werden Fremdorganismen über die Proteine/Peptide, Flagellin, *translocation elongations factor TU* und Xylanase

1 Einleitung

erkannt (Desaki *et al.*, 2018). Die Erkennung der PAMPs und MAMPs erfolgt über extrazelluläre Rezeptoren, die entweder aus einem *Leucin-Rich-Repeat* (LRR) oder einem Lysin-Motiv mit intrazellulärem Protein oder Kinase bestehen (Desaki *et al.*, 2018). Die LRR-Rezeptor-ähnlichen Kinasen (RLK) oder LRR-Rezeptor-ähnlichen Proteine (RLP) sind hauptsächlich in die Erkennung von MAMPs involviert, während die LysM-RLKs und LysM-RLPs, sofern sie in die Abwehr involviert sind, Chitin und Peptidoglycan binden (Desaki *et al.*, 2018). Weiterhin sind LysM-RLKs und LysM-RLPs in die Ausbildung einer Symbiose involviert und binden dann NOD-Faktoren und Mykorrhiza-Lipo-chitooligosaccharide (Myc-LCOs) (Desaki *et al.*, 2018).

Eine weitere Möglichkeit zur Reaktion auf eine Infektion ist die ETI (*Effector Triggered Immunity*), die durch eine direkte oder indirekte Interaktion von pathogenen Elicitoren und pflanzlichen R-Genen induziert wird (Boller und Felix, 2009). Die R-Gene der Pflanze sind dabei jeweils auf die spezifischen Elicitoren des Pathogens angepasst (Boller und Felix, 2009). Die durch R-Gene induzierte Abwehr resultiert in der hypersensitiven Reaktion, die durch programmierten Zelltod und durch lokale Nekrose charakterisiert wird (Boller und Felix, 2009).

Die Erkennung von pathogenen sowie biotischen Organismen erfolgt über strukturell ähnliche Rezeptoren. Es zeigte sich, dass für die Erkennung von symbiontischen Pilzen in Leguminosen extrazelluläre Rezeptoren mit Lysin-Motiven verantwortlich sind (Limpens *et al.*, 2003; Radutiou *et al.*, 2003), die jedoch auch in die Erkennung von abwehrbasierten Elicitoren in Reis eine Rolle spielen und strukturell ähnlich zu den NOD-Faktor-Rezeptoren der Leguminosen sind (Kaku *et al.*, 2006). Genre *et al.* (2013) vermuteten, dass die Entscheidung zwischen einem Pathogen oder Symbiosepartner von der Länge des Chitinmoleküls abhängig ist.

1.2.1 Lysin-Motiv-Rezeptor-ähnliche Kinasen

Das Lysin-Motiv (LysM) wurde erstmals in dem vom *Bacillus-Virus Phi29* gebildeten Lysozym entdeckt und wies eine direkte Wiederholung auf (Garvey *et al.*, 1986). Die Wiederholungen, bestehend aus 44 Aminosäuren, sind durch 7 Aminosäuren voneinander getrennt (Buist *et al.*, 2008).

Die meisten LysM-tragenden Proteine sind bakterielle Peptidoglycan-Hydrolasen, weiterhin kommen Lysin-Motive in Bakteriophagen-Lysinen vor (Buist *et al.*, 2008). Einige LysM-Domänen-tragende Proteine sind Virulenzfaktoren humaner bakterieller Pathogene (Buist *et al.*, 2008). Außerdem sind sie in bakteriellen Peptidoglycanen, Hydrolasen und Peptidasen, Chitinasen, Esterasen, Reduktasen und Nukleotidasen zu finden (Buist *et al.*, 2008). LysM-

1 Einleitung

Domänen sind in putativen Proteinen von Pflanzen, Pilzen, Tieren und Menschen vorhanden (Buist *et al.*, 2008). In pflanzlichen LysM-Rezeptor-ähnlichen Kinasen ist ein konserviertes Motiv mit unbekannter Funktion vorhanden (Buist *et al.*, 2008). Die Länge der Lysin-Motive kann von 44–65 Aminosäuren variieren (Buist *et al.*, 2008). Mehrere Lysin-Motive können durch Sequenzelemente wie Serin, Threonin und Asparaginsäure oder Prolin voneinander getrennt sein, sodass flexible Regionen zwischen den Lysin-Motiven entstehen können (Buist *et al.*, 2008).

LysM-Rezeptor-ähnliche Kinasen (LysM-RLKs) sind Transmembranproteine, die eine extrazelluläre Domäne, eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Region, ähnlich einer Kinase zur Signalweiterleitung, aufweisen und zur Wahrnehmung der Umgebung dienen (Buredia *et al.*, 2018). Neben der Erkennung von nützlichen und schädlichen Organismen (Anatolín-Llovera *et al.*, 2012) kommen den LysM-RLKs Funktionen bei der Zell-Organ-Kommunikation und eine Rolle beim abiotischen Stress zu (Buredia *et al.*, 2018). Pflanzliche LysM-RLKs wurden erstmals bei Leguminosen bei der Ausbildung einer Symbiose mit stickstofffixierenden Bakterien entdeckt; sie weisen strukturell 1–3 LysM-Domänen, eine Transmembranregion sowie eine Kinase-Domäne auf (de Jonge und Thomma, 2009). Die Kombination von LysM-Domäne und Kinase findet sich ausschließlich in Pflanzen (Zhang *et al.*, 2007). Weiterhin können die LysM-RLKs in ihrer Struktur sehr unterschiedlich sein, da bei Vorhandensein von mehr als zwei Lysin-Motiven diese sich in ihrer Protein- und Sequenzstruktur unterscheiden (Zhang *et al.*, 2007). LysM-RLKs sind sowohl in die Erkennung von Pathogenen als auch in die Erkennung nützlicher Symbioseformenden Bakterien und/oder Pilzen involviert. LysM-RLKs lassen sich anhand der Kinase-Funktion in zwei Gruppen gliedern (Gust *et al.*, 2012). Weiterhin gibt es LysM-Proteine ohne eine intrazelluläre Kinase-Domäne sowie extrazelluläre und intrazelluläre nicht-sekretorische Proteine (Gust *et al.*, 2012).

Die LysM-RLKs *OsCERK1* (*Oryza sativa* - Reis), *AtCerk1* (*A. thaliana* – Ackerschmalwand), *MtLYK3* (*M. truncatula* – Schneckenklee), *LjNFR1* (*L. japonicus* – Hornklee) und *PsSYM37* (*Pisum sativum* – Erbse) sind strukturell ähnlich aufgebaut, die Rezeptoren *OsCERK1* und *AtCERK1* sind in die Abwehr involviert, wohingegen *MtLYK3*, *LjNFR1* und *PsSYM37* an der Ausbildung der Symbiose beteiligt sind (Gust *et al.*, 2012). Die Rezeptoren *MtNFP*, *LjNFR5*, *PsSYM10* und *PaNFP* (*Parasponia andersonii* – Hanf) kodieren ebenfalls für LysM-RLKs, unterscheiden sich jedoch in ihrer Kinase-Funktion und sind in die Ausbildung einer Symbiose involviert (Gust *et al.*, 2012). Strukturell ähnliche LysM-RLKs mit einer Funktion in der Abwehr von pathogenen Organismen sind nicht vorhanden (Gust *et al.*, 2012). In

1 Einleitung

O. sativa und *A. thaliana* gibt es hingegen LysM-Rezeptor-Proteine (*OsCEBiP*, *AtLYM1* und *AtLYM3*), die in die Abwehr von mikrobiellen Pathogenen involviert sind (Gust *et al.*, 2012). LysM-Rezeptor-ähnliche Proteine, die in die Ausbildung einer Symbiose involviert sind, sind nicht vorhanden (Gust *et al.*, 2012).

1.2.2 Symbiose mit mykorrhizierenden Pilzen

Bei 80 % der Landpflanzen, Lebermoosen, Farnen, holzigen Gymnospermen und Angiospermen sowie Gräsern ist eine Gemeinschaft mit filamentösen Pilzen zur verbesserten Nährstoffaufnahme zu finden (Bonfante und Anca, 2009). Diese Gemeinschaft von photosynthetisch aktiven Pflanzen und filamentösen Pilzen wurde vor ca. 450 Millionen Jahren als Vorgänger der heutigen Mykorrhizierung ausgebildet (Bonfante und Anca, 2009). Die Symbiose zwischen dem mykorrhizierenden Pilz und der Pflanze besteht in einem vorteilhaften Austausch von Mineralien aus dem Boden über die pilzlichen Organe zur Verbesserung der pflanzlichen Produktivität und Resistenz gegenüber Stressfaktoren (Bonfante und Anca, 2009) und diversen von der Pflanze durch Photosynthese gewonnenen Formen von Kohlenstoff an die pilzlichen Symbiosepartner (Casieri *et al.*, 2013). Der Pflanze wird durch die Symbiose mit Mykorrhizen eine erhöhte Wasseraufnahme ermöglicht sowie eine erhöhte Menge Stickstoff und Phosphor aus dem Boden zur Verfügung gestellt (Egil und Brunner, 2011). Des Weiteren bedingt eine Symbiose mit den Wurzelpilzen einen erhöhten Schutz vor Schadstoffen und Frost sowie die Förderung des Pflanzenwachstums (Egil und Brunner, 2011).

Ungefähr 6.000 Arten der *Glomeromycota*, *Ascomycota* und *Basidiomycota* wurden als zur Mykorrhizierung fähige Pilze identifiziert (Bonfante und Anca, 2009). Die Ausbildung einer Mykorrhizierung ist wirtsspezifisch (Frank, 1885) und kann sich mitunter bei Pappeln unterschiedlicher Sektionen unterscheiden (Labbé *et al.*, 2019). Anhand ihrer Assoziation an die Wurzeln lassen sich die Formen der mykorrhizierenden Pilze in verschiedene Gruppen gliedern: Endomykorrhizierende Pilze (arbuskuläre Pilze), ektomykorrhizierende Pilze, erikoide Mykorrhizen und Mykorrhizen bei Orchideen. Pappeln können sowohl mit endomykorrhizierenden Pilzen als auch mit ektomykorrhizierenden Pilzen eine Symbiose eingehen (Labbé *et al.*, 2019). Bei der Symbiose mit endomykorrhizierenden Pilzen penetrieren die Pilze über ein Hyphopodium die Wurzelzellen und bilden verzweigte Strukturen (Arbuskeln) in den Kortikalzellen aus, um einen Stoffaustausch zu generieren (Bonfante und Anca, 2009). Die Ektomykorrhizierung erzeugt eine Wurzelmorphogenese, bei der feine Modifikationen in den Epidermal- und Kortikalzellen des pflanzlichen Wirtes erzeugt werden. Die Hyphen des Pilzes bilden dabei einen Mantel um die Wurzelspitze aus

1 Einleitung

(Bonfante und Anca, 2009; Bonfante, 2001) und erzeugen in der Rhizosphäre ein feines, stark verzweigtes Netz (*Hartig Net*) um die Wurzeln der Wirtspflanze.

Die Mykorrhizierungsrate eines Pilzes kann an Pappeln unterschiedlicher Sektionen variieren (Labbé *et al.*, 2019). Eine geringere Mykorrhizierungsrate konnte für *Populus deltoides* im Vergleich zu *Populus trichocarpa* bei Inokulation mit dem ektomykorrhizierenden Pilz *Laccaria bicolor* beobachtet werden (Labbé *et al.*, 2011; Tagu *et al.*, 2001). Der Einfluss einer Mykorrhizierung auf Pappeln wurde bereits in einigen Studien untersucht. Beispielsweise zeigten Bojarczuk *et al.* (2015), dass Kupfer- und Bleitolerante *P. × canescens* bei einer Symbiose mit den ektomykorrhizierenden Pilzen *Hebeloma crustuliniforme* und *Paxillus involutus* eine erhöhte Aufnahme der Schwermetalle aus der kontaminierten Erde aufwies als nicht-mykorrhizierte Pflanzen (Bojarczuk *et al.*, 2015). Weiterhin zeigte sich, dass mykorrhizierte Pflanzen aus der *in vitro*-Kultur höhere Überlebensraten bei der Akklimatisierung in der *ex vitro*-Kultur als nicht-mykorrhizierte Pflanzen aufwies (Bojarczuk *et al.*, 2015). Liu *et al.* (2015) untersuchten die Auswirkung einer Endomykorrhizierung auf die Biomasseproduktion von *P. × canadensis* unter Trockenstress und zeigten, dass mykorrhizierte Pappeln ein höheren Chlorophyllgehalt, höhere Chlorophyllparameter und eine erhöhte Gasaustauschrate aufwies und daher besser unter Stressbedingungen wuchsen. Weiterhin konnte eine erhöhte Biomasse bei der Gabe zweier unterschiedlicher mykorrhizierender Pilze, *Paxillus involutus* (Ektomykorrhizierung) und *Glomus mossaceae* (Endomykorrhizierung), bei den Hybridpappeln *P. euamericana* nachgewiesen werden (Lopez-Agullion und Garbaye, 1989). Die Gabe beider Mykorrhizen verringerte die Anzahl der mykorrhizierten Wurzeln, führte jedoch zu einer erhöhten Biomasse (Lopez-Agullion und Garbaye, 1989). Die Einzelinokulation mit dem endomykorrhizierenden Pilz *Paxillus involutus* führte zu keiner gesteigerten Biomasse (Lopez-Agullion und Garbaye, 1989). Eine Mykorrhizierung mit ausgewählten Pilzen kann demnach Pappeln deutlich widerstandsfähiger gegenüber Stressbedingungen machen und den Ertrag steigern.

Weitere symbiontische Beziehungen zwischen Pflanzen und Wurzelpilzen, die nicht an Pappeln vorkommen, sind erikoide Mykorrhizen und Orchideen-Mykorrhizen (Bonfante und Anca, 2009). Die erikoiden Pilze dringen in die in die Epidermalzellen ein und bilden verschiedenen spiralförmige Infektionseinheiten aus, die Orchideen-Mykorrhizen hingegen bilden Infektionseinheiten aus, die sich hauptsächlich in den inneren Schichten der Wurzeln befinden (Bonfante und Anca, 2009).

1.2.3 Symbiose mit stickstofffixierenden Bakterien

Eine Symbiose mit stickstofffixierenden Bakterien, die als Rhizobien bezeichnet werden, erfolgt mit Wirtspflanzen, die der Familie der Leguminosen angehören (Beringer *et al.*, 1979). Die Stickstofffixierung erfolgt in Wurzelknollen, die von der Wirtspflanze bei Interaktion mit dem Rhizobium gebildet werden (Beringer *et al.*, 1979). Die Symbiose zwischen Leguminosen und Rhizobien ist für die Wirtspflanze nicht essentiell, resultiert jedoch in einem erhöhten Proteinanteil im Vergleich zu Weizen (Beringer *et al.*, 1979).

Die Ausbildung einer Symbiose mit stickstofffixierenden Bakterien erfolgt über die Erkennung von Lipochitin-Oligosacchariden, die als NOD-Faktoren bezeichnet werden (Broghammer *et al.*, 2012). Die NOD-Faktoren bestehen aus einer Kette aus vier bis fünf β -1,4-verbundenen N-Acetyl-glucosaminen (Lerouge *et al.*, 1990), die weiterhin einen terminal N-acetylierten Zucker und eine Fettsäurekette von 16–18 Atomen aufweisen (Cullimore *et al.*, 2001). Verschiedene Rhizobien weisen strukturelle Unterschiede in den NOD-Faktoren auf, die chemische Substitutionen an den reduzierten oder nicht-reduzierten Zuckern und der Acetylkette umfassen (Cullimore *et al.*, 2001). Die NOD-Faktoren binden an LysM-Rezeptor-Kinasen, die im Folgenden eine Reaktion in der Zelle auslösen (Radutoiu *et al.*, 2003, Amor *et al.*, 2003; Zhukov *et al.*, 2008). Zwei LysM-Rezeptor-Kinasen in *Lotus japonicus* kodieren für *NFR1* zwei extrazelluläre LysM-Domänen und für *NFR5* drei extrazelluläre LysM-Domänen sowie eine zytoplasmatische Serin/Threonin-Kinase-Domäne (Radutoiu *et al.*, 2003). Beide LysM-Rezeptor-Kinasen sind in die Ausbildung einer Symbiose mit stickstofffixierenden Bakterien involviert. In *Medicago truncatula* kodiert die LysM-Rezeptor-Kinase ein Protein mit 2 LysM-Domänen, die direkt mit den NOD-Faktoren interagieren (Limpens *et al.*, 2003).

Nach einer Erkennung der NOD-Faktoren finden in den Wurzelhaaren spezifische morphologische Veränderungen statt, damit das Bakterium erfolgreich in die pflanzliche Zelle gelangen kann (Zhukov *et al.*, 2008). Hierzu wird das Bakterium über Endozytose in die Knötchen der Pflanzenwurzelzelle eingeschleust und fungiert dort als Bakterioid, das der Pflanze bei Stickstoffmangel reduzierten Stickstoff zur Verfügung stellt (Zhukov *et al.*, 2008) und den von der Pflanze durch Photosynthese erzeugten Kohlenstoff erhält (Radutoiu *et al.*, 2003).

1.2.4 Pathogene biotische Faktoren – *Melampsora spec.*

Zu den pflanzlichen biotischen Pathogenen zählen Pilze, Viren, Bakterien, Insekten und Säugetiere. Diese biotischen Einflüsse können sich direkt auf das Wachstum und den Ertrag der Pflanzen auswirken. Wie in Abschnitt 1.2 erläutert, haben Pflanzen Strategien entwickelt, um auf die Anwesenheit von Pathogenen zu reagieren. Auf Grund der intensiven Kultur von einzelnen Pappelklonen in Kurzumtriebsplantagen (KUPs) sind diese insbesondere anfällig gegenüber Pathogenen, die spezifisch diesen einen Pappelklon in der Kurzumtriebsplantage befallen, sodass der Ertrag der gesamten Plantage vermindert wird. Zu den verheerendsten Krankheiten, die Pappeln befallen können, zählt der Rostpilz *Melampsora spec.* (Duplessis *et al.*, 2009).

Rostpilze gehören zu den Basidiomycota (Ständerpilzen) der Ordnung Uredinales (Schardl *et al.*, 2003). Zahlreiche Kulturpflanzen, wie beispielsweise Getreide, Nutzhölzer, tropische Nutzpflanzen, Gemüse und Zierpflanzen werden von Rostpilzen befallen (Fink *et al.*, 1989). Rostinfektionen auf Pappelblättern werden von *Melampsora spec.* verursacht und bewirken Ertragseinbußen von bis zu 50 % in Kurzumtriebsplantagen (Dowkiw *et al.*, 2003), hierbei spielt der Zeitpunkt der Infektion eine entscheidende Rolle. Individuen, die im Spätsommer befallen werden, zeigen eine erhöhte Frostanfälligkeit auf Grund einer verzögerten Verholzung (Becker *et al.*, 2014). Eine Infektion mit Pappelrost äußert sich über gelblich bis rostfarbene Sporenlager, die auf den Blattunterseiten der infizierten Blätter zu finden sind (Abbildung 1.1). Je nach Stärke der Infektion kann die gesamte Blattunterseite mit Sporenlagern bedeckt sein. Infizierte Individuen zeigen eine verminderte Photosyntheserate, vorzeitigen Laubabfall und eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber anderen Schaderregern (Dowkiw *et al.*, 2003). *Melampsora spec.* zählt zu den verheerendsten Pappelpathogenen (Steenackers *et al.*, 1996); ein Befall wird durch eine feuchtwarme Witterung sowie die Nähe zu Lärchen, die insbesondere dem Pappelrost *M. larici-populina* als Zwischenwirt dienen, begünstigt (Becker *et al.*, 2014).

1 Einleitung



Abbildung 1.1: Pappelrost auf einem Pappelklon der Sektion *Populus* (Turesson 141)

Dargestellt sind drei Blätter des *Populus tremuloides*-Klons Turesson 141 mit Pappelrostinfektion. Aufnahme: Katrin Groppe, Thünen-Institut für Forstgenetik, Großhansdorf.

Innerhalb der Art *M. larici-populina* existieren unterschiedliche Pathotypen, die sich über die Zeit in Anpassung an den Wirt entwickelt haben (Pinon und Frey, 2005). Die Pathotypen werden dabei in einzelnen Gruppen, bestehend aus einem Buchstaben für das Vorkommen wie beispielsweise E als Kennung für Europa und einer Zahl für das Auftreten des neuen Pathotyps, gegliedert (Pinon und Frey, 2005). Die Variabilität der Pathogenität innerhalb von *M. larici-populina* wird über die Virulenz und die Aggressivität bestimmt (Pinon und Frey, 2005). Bis 1997 waren acht Pathotypen für Europa bekannt (Pinon und Frey, 2005). Steenackers *et al.* (1996) berichteten, dass veränderte *M. larici-populina* Pathotypen vormals resistente Pappelklone infizierten. Im europäischen Raum verursacht hauptsächlich *M. larici-populina* an Pappeln der Sektionen *Aigeiros* und *Tacamahaca* Ertragseinbußen, die gegenüber diesem Pathogen nicht resistent sind (Frey *et al.*, 2005). Auf Grund ihrer Anfälligkeit gegenüber Pappelrost wird geraten, die Pappelklone *Beaupré*, *Unal*, *Raspalje*, *Rap* und *Donk* nicht mehr für den Anbau in Kurzumtriebsplantagen zu verwenden (Becker *et al.*, 2014).

M. larici-populina zeichnet sich wie andere Rostpilze durch einen komplexen Lebenszyklus mit 5 verschiedenen Sporentypen und zwei Wirtspflanzen aus (Hacquard *et al.*, 2012). Der Lebenszyklus von *M. larici-populina* beinhaltet zwei Fortpflanzungsmöglichkeiten auf zwei verschiedenen Wirten. Die sexuelle Reproduktion erfolgt auf der Lärche (*Larix* sp.), während die asexuelle Produktion auf Pappelblättern verläuft (Gerard *et al.*, 2006). Vialle *et al.* (2011) gliederten die Fortpflanzung von *Melampsora* spec. in 5 Sporenstadien: Stadium-0: Im Spermogonium werden auf dem aecialen Wirt (Zwischenwirt) Spermatogonien aus dem haploiden Thallus gebildet. Der haploide Thallus entsteht nach der Infektion mit einer Basidiospore und bildet monokaryotische Sporen aus. Stadium-1: *Aecium primordia* (haploide

1 Einleitung

Hyphen) werden ebenfalls vom Sporangium gebildet. Wenn die haploiden Hyphen mit den monokaryotischen Sporen fusionieren, entstehen dikaryotische Aeciosporen, die mit dem Wind auf den telialen Wirt (Hauptwirt: *Populus spec.*) übertragen werden. Stadium-2: Nach der Keimung der Aeciosporen auf dem telialen Wirt, bildet sich ein Uredium, das Uredosporen ausbildet, durch die der Wirt während der Wachstumsphase immer wieder neu infiziert werden kann. Stadium-3: Unter der Blattepidermis werden Telia ausgebildet, in denen sich dikaryotische Teliosporen befinden. Die Teliosporen überwintern in dem herabgefallenen Laub und bilden nach der Karyogamie Basidien aus. Stadium-4: Nach der Meiose bildet jedes Basidium vier Basidiosporen aus, die den aecialen Wirt infizieren und einen haploiden Thallus formen, der die Sporangien und Aecien bildet.

Wan *et al.* (2015) zeigten, wie sich Uredosporen von *M. larici-populina* beim Befall von *P. deltoides* verhalten. Zunächst bilden die Uredosporen einen Keimschlauch aus, der über die Blattunterseite wächst, um über eine Spaltöffnung in das pflanzliche Gewebe einzudringen (Wan *et al.*, 2015). Im Gegensatz zu anderen *Melampsora spec.* scheint *M. larici-populina* kein Appressorium auszubilden (Wan *et al.*, 2015). Weiterhin beobachteten Wan *et al.* (2015), dass der Keimschlauch gelegentlich die Epidermis direkt penetrierte. Nach der Invasion des Keimschlauches über die Spaltöffnung beobachteten Wan *et al.* (2015), dass die Blätter von *P. deltoides* in sich zusammenfielen. Im Folgenden wurde das Uredium als gelb-orange Pustel sichtbar, die weitere Uredosporen produziert (Wan *et al.*, 2015).

Durch diesen immerwährenden Kreislauf können immer mehr Blätter der Pappeln befallen werden. Wenn Pappeln in Monokulturen angepflanzt werden, bei denen immer nur ein Klon der gleichen Sektion neben dem anderen steht, können *Melampsora*-Sporen, die durch Wind verbreitet werden, alle Pflanzen im Bestand befallen. Handelt es sich bei dem *Melampsora*-Stamm um jenen, der ein verheerendes Schadbild erzeugt, sind hohe Ertragseinbußen zu verzeichnen.

1.3 Kandidatengene Lysin-Motiv-Rezeptor-ähnliche Kinasen

Wie im Abschnitt 1.2 beschrieben, reagieren Pflanzen auf die Zellwandbestandteile von Pathogenen, wie z.B. auf das Chitin von pathogenen Pilzen oder auf die Chitin-Oligosaccharide von symbiontischen Pilzen. Proteine, die einen Lysin-Motiv (LysM) aufweisen, spielen bei der Interaktion zwischen Mikroorganismen und Pflanzen eine wichtige Rolle. Die LysM-Proteine sind sowohl in die Ausbildung einer Symbiose wie auch in die Abwehr von schädlichen Pilzerregern involviert (Buist *et al.*, 2008). Die Erkennung der pilzlichen Chitin-Oligosaccharide erfolgt über Membranproteine, die intrazellulär eine Kinase aufweisen. Über die Kinase wird bei Erkennung eines Pathogens die Immunantwort der

1 Einleitung

Pflanze vermittelt (Zipfel *et al.*, 2017). Für die Ausbildung einer arbuskulären Symbiose sind Myc-Faktoren und bei der Ausbildung einer Symbiose über Wurzelknollen sind Nod-Faktoren von essentieller Bedeutung (Zipfel *et al.*, 2017). Bei den genannten Faktoren handelt es sich um Chitin-Oligosaccharide, die sich durch Lipidmodifikationen von den Chitin-Oligosacchariden unterscheiden, die eine Immunantwort vermitteln (Zipfel *et al.*, 2017). Zhang *et al.* (2007) wiesen strukturelle Ähnlichkeiten von LysM-RLKs in den nicht-Leguminosen *Arabidopsis*, Pappel (*P. trichocarpa*) und Reis nach. Zhang *et al.* (2007) spekulierten, dass die orthologen von *NFR1* und *NFR5* aus *L. japonicus* eine Rolle bei der Ausbildung einer Symbiose in anderen Organismen spielen könnten, jedoch ist auch eine andere Funktion dieser Gene möglich. Wan *et al.* (2008) zeigten eine teilweise reduzierte Resistenz gegenüber pilzlichen Pathogenen bei *Arabidopsis lysm-rlk1* Mutanten. Auf Grund der nicht vollständig aufgehobenen, sondern nur reduzierten Resistenz wurde vermutet, dass weitere Rezeptoren die Immunantwort auf pilzliches Chitin vermitteln (Wan *et al.*, 2008). Miyata *et al.* (2014) berichteten für das *NFR1/LYK3*-Homolog *OsCerk1* aus Reis, das eine LysM-Rezeptor-ähnliche Kinase kodiert, eine Funktion bei der Ausbildung einer arbuskulären Symbiose. *OsCerk1* besitzt zudem eine Funktion bei der Abwehr von Pathogenen, deren Zellwand aus Chitin besteht (Shimizu *et al.*, 2010). Zhang *et al.* (2007) wiesen nach, dass *NFR5* aus *L. japonicus*, das als NOD-Faktor fungiert, als zwei orthologe Gene (*PtLyk2* und *PtLyk11*) in *P. trichocarpa* vorliegt. Die Funktion der orthologen Gene in der Pappel ist derzeit noch nicht untersucht.

1.4 Genom-Editierung

Die Veränderung des Genoms bzw. bestimmter Bereiche der DNA dient einerseits dazu zu verstehen, welche Funktion die kodierenden Bereiche auf den Organismus haben, andererseits um mögliche Eigenschaften eines Organismus zu modifizieren. Funktionsanalysen bestimmter Gene sollen beispielsweise zeigen, ob eine Resistenz gegenüber einem Pathogen durch ein bestimmtes Protein vermittelt wird. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, experimentell zu eruieren, welches Gen an der Ausbildung einer Eigenschaft beteiligt ist. Um die Funktion eines Gens zu analysieren, wird zumeist versucht, einen Funktionsverlust (*Knockout*) des Gens zu generieren, um im Anschluss die Auswirkungen mit einer möglichen Funktion des Gens korrelieren zu können. Die Möglichkeiten einer Modifikation sind vielfältig. Beispielsweise können durch mutagene Chemikalien oder UV-Strahlung Veränderungen am Erbgut eines Organismus erfolgen. Dabei wird der Organismus gezielt der mutagenen Substanz ausgesetzt. Bei dieser Methode können viele verschiedene Mutationen am Erbgut erfolgen, die dementsprechend auf viele unterschiedliche Gene wirken und somit

1 Einleitung

einen gänzlich neuen Phänotyp erzeugen können. Ob der entstandene Genotyp die gewünschten Eigenschaften zeigt, kann nicht garantiert werden. Bei diesem Verfahren ist nicht bekannt, an welcher Position im Genom eine Änderungen erfolgt. Bei der Vielzahl der möglichen Veränderungen an diversen Positionen im Genom kann nicht vorhergesagt werden, wie sich die Veränderungen auf den Organismus auswirken.

Die oben genannten Methoden zur Erzeugung von Mutationen im Genom sind unspezifisch und daher nachteilig, wenn man gezielt ein bestimmtes Gen und dessen Funktion untersuchen möchte. Zur gezielten Modifikation von Genen dienen CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)/Cas9 (CRISPR-assoziierte), TALEN (*Transcription Activator-Like Effector Nucleasen*), Zinkfinger-Nukleasen und Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese (ODM). Mittels TALEN kann an spezifischen Positionen im Genom ein Doppelstrangbruch generiert werden (Nemudryi *et al.*, 2014) ebenso über die synthetischen Restriktionsenzyme die als Zinkfinger-Nukleasen bezeichnet werden (Weinthal *et al.*, 2010). Die Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese wird verwendet, um über Oligonukleotide Insertionen oder Deletionen in eine bestimmte DNA-Sequenz einzubringen (Wallace *et al.*, 1981). Mit Ausnahme der ODM wird mit den genannten Methoden ein Doppelstrangbruch erzeugt, sodass durch die zelleigene Reparatur Insertionen und Deletionen am Doppelstrangbruch hervorgerufen werden können. Die Methoden eint, dass durch die Modifikation von Einzelnukleotiden eine Veränderung oder der Verlust des resultierenden Proteins zur Funktionsanalyse generiert werden soll.

Auch über CRISPR kann an einer beliebigen Position im Genom ein Doppelstrangbruch generiert werden. Die erzeugten Doppelstrangbrüche werden von der pflanzlichen Zelle erkannt und durch zelleigene Mechanismen wieder zusammengefügt. Bei dem Zusammenfügen der beiden Doppelstränge kann es neben einer einwandfreien auch zu einer fehlerhaften Reparatur kommen, bei der Nukleotide inseriert oder deletiert werden und somit Mutationen entstehen.

1.4.1 CRISPR/Cas ein Abwehrmechanismus aus Bakterien und Archaeen

CRISPR`s wurden erstmals Ende der 1980er Jahre in *Escherichia coli* entdeckt (Ishino *et al.*, 1987). Die Funktion der entdeckten homologen und repetitiven Sequenzeinheiten war den Forschern zu diesem Zeitpunkt noch unklar (Ishino *et al.*, 1987). Das gefundene Strukturmotiv wurde zunächst anhand seiner Struktur mit diversen Akronymen versehen (Deveau *et al.*, 2010), letztendlich wird jedoch das Akronym CRISPR verwendet. Das CRISPR-Sequenzmotiv ist in den prokaryotischen Bakterien und Archaeen zu finden, jedoch in Eukaryoten und Viren nicht vorhanden (Jansen *et al.*, 2002). Die letztgenannten Autoren

1 Einleitung

konnten zeigen, dass sich das CRISPR-Strukturmotiv aus mehreren 21–37 Basenpaaren langen Wiederholungen (*Repeats*) zusammensetzt, die durch nicht-repetitive Einheiten (*Spacer*) getrennt sind. Weiterhin beschrieben Jansen *et al.* (2002) eine CRISPR-Motiv-flankierende *Leader*-Sequenz sowie *Cas*-(CRISPR-assoziierte) Gene. Anhand von Strukturanalysen konnte nachgewiesen werden, dass charakteristische Strukturen von Helicasen und Exonucleasen in einigen der untersuchten *Cas*-Gene vorhanden waren (Jansen *et al.*, 2002). Weitere Untersuchungen des CRISPR-Strukturmotivs zeigten, dass die *Spacer*-Elemente Teilstücke von Phagen-DNA sind (Pourcel *et al.*, 2005) und damit das CRISPR/Cas-System als adaptives Immunsystem gegenüber Bakteriophagen dient (Barrangou *et al.*, 2007).

Der Mechanismus zur Abwehr von Fremd-Nukleinsäure in der prokaryotischen Zelle mittels CRISPR/Cas wird in drei Schritte gegliedert: (1) Integration von Fremd-Nukleinsäure in den CRISPR-Locus als neue *Spacer*, (2) Transkription der CRISPR's und Prozessierung der crRNA (CRISPR-RNA) sowie dessen Bindung an das assoziierte Cas-Protein, (3) Neutralisierung der Fremdnukleinsäure durch gezieltes Auffinden anhand der crRNA und Restriktion durch das Cas-Protein (Jore *et al.*, 2012). Die Resistenz der Bakterien ist demnach abhängig von den vorhandenen *Spacern* im CRISPR-Locus. Infektionsversuche von *S. thermophilus* mit Phagen zeigten, dass die Phagen-Nukleinsäure, trotz Resistenz gegenüber den Phagen, in die bakterielle Zelle eingeschleust wurde (Deveau *et al.*, 2008). Der Resistenz-vermittelnde Mechanismus erfolgt demnach nach der Injektion der Phagen-Nukleinsäure. Deveau *et al.* (2008) zeigten bei Infektionsversuchen von *S. thermophilus* mit Phagen, dass neue *Spacer* immer direkt an die *Leader*-Sequenz angehängt und dass je Infektion 1–2 neue *Spacer* in den CRISPR-Locus integriert werden. Ausschlaggebend für die Funktionalität des CRISPR/Cas-Systems ist einerseits die identische Sequenz des *Protospacers* (virale Nukleinsäure) sowie dem *Spacer* (bakterielle Nukleinsäure im CRISPR) und andererseits das in dem Phagen-Genom vorhandene *proto-spacer adjacent motif* (PAM) (Deveau *et al.*, 2008). Treten in den die *Protospacer*-flankierenden PAM-Sequenzen Nukleotidveränderungen auf, konnten die Phagen *S. thermophilus* infizieren (Deveau *et al.*, 2008). Deveau *et al.* (2008) schlussfolgerten, dass die PAM-Sequenz neben der identischen Sequenz der *Spacer* eine entscheidende Rolle bei der CRISPR-vermittelnden Abwehr gegen Fremdnukleinsäure spielt.

1.4.2 Klassifizierung der Cas-Proteine

Die Funktionalität des adaptiven Immunsystems wird neben den CRISPR durch die Cas-Proteine gewährleistet. Hierzu sind in verschiedenen Stadien der Immunantwort unterschiedliche Cas-Proteine aktiv (Makarova *et al.*, 2015). Makarova *et al.* (2015)

1 Einleitung

gliederten die verschiedenen *Cas*-Gene anhand ihrer Funktion in vier verschiedene Gruppen: (1) Adaption der *Spacer*, (2) Prozessierung der crRNA und Bindung an die Zielsequenz, (3) Restriktion der Zielsequenz (Interferenz) und (4) regulatorische oder weitere CRISPR-assoziierte Funktionen. Die in nahezu allen CRISPR/Cas-Systemen vorhandenen Cas1- und Cas2-Proteine sind für die Integration der *Spacer* in den CRISPR-Locus verantwortlich (Nuñez *et al.*, 2014). Grundsätzlich sind zwei Klassen an CRISPR/Cas-Systemen zu finden, die sich anhand ihrer *Cas*-Gene unterscheiden lassen (Makarova *et al.*, 2015). Die Klasse I setzt sich aus den Typen I, III und IV zusammen, Klasse II aus den Typen III und V (Makarova *et al.*, 2015). Klasse I besteht aus einem CRISPR-assoziierten Kaskaden-Komplex, der sich aus mehreren Cas-Proteinen zusammensetzt. Klasse II weist ein Effektor-Komplex in einem einzelnen Protein, wie beispielsweise Cas9, auf (Makarova *et al.*, 2015). Anhand ihrer *Cas*-Gene werden die beiden Klassen in verschiedene Typen differenziert (Makarova *et al.*, 2011). Typ I verfügt über Cas3, Typ II über Cas9 und Typ III über Cas10 (Makarova *et al.*, 2015; Makarova *et al.*, 2011). Makarova *et al.* (2015) wiesen zwei weitere Cas-Typen nach: Typ IV wurde der Klasse I zugeordnet und ist durch das Fehlen von Cas1 und Cas2 als eigenständiger Cas-Typ definiert worden. Typ V wurde der Klasse II zugeordnet und enthält das Protein CpfI, das strukturell ähnlich zu Cas9 ist.

Die Untersuchung zur Funktionsweise der verschiedenen CRISPR/Cas-Systeme ist derzeit noch nicht abgeschlossen und für einige Cas-Proteine ist die genaue Funktion noch nicht hinreichend bekannt (Makarova *et al.*, 2015).

1.4.3 CRISPR/Cas9 als natürliches System

Die Cas9 trug seit der Entdeckung des CRISPR/Cas-Systems verschiedene Bezeichnungen wie COG3513, Csx12, Cas5 oder Csn1. Cas9 ist ein einzelnes großes Protein mit zwei einzelnen Nuklease-Domänen, einer HNH-Nuklease und einer *RUVc-like*-Nuklease (Makarova *et al.*, 2011). Deltcheva *et al.* (2011) untersuchten das CRISPR/Cas9-System in *S. pyrogenes* und zeigten, dass *Upstream* vom CRISPR-Locus RNAs transkribiert werden. Die als tracrRNAs (*trans-activation CRISPR RNAs*) bezeichneten RNAs sind ausschlaggebend für die Synthese der crRNAs, die ausgehend von der pre-crRNA prozessiert wird (Deltcheva *et al.*, 2011). Weiterhin zeigten Deltcheva *et al.* (2011), dass an der Synthese der crRNAs die wirtseigene Ribonuklease III (RNase III) und die Cas9 beteiligt sind. Die Cas9 bildet mit der reifen crRNA und der tracrRNA einen Komplex aus, der doppelsträngige Fremd-DNA in der Zelle restringiert (Jinek *et al.*, 2012). Die CRISPR/Cas9-vermittelte Restriktion erfolgt dabei 3 Nukleotide *Upstream* der PAM-Sequenz, wobei jede der beiden in der Cas9 enthaltenen Nuklease-Domänen je einen DNA-Strang schneidet (Jinek *et al.*, 2012).

1 Einleitung

Die CRISPR/Cas9-vermittelnde Resistenz gegenüber fremder Nukleinsäure erfolgt zusammenfassend zunächst über die Synthese der tracrRNA, der *Cas*-Gene und der CRISPR. Die Cas9 bildet im Folgenden mit der tracrRNA einen Komplex aus, der sich an die pre-crRNA anlagert, während die RNase III die crRNA prozessiert. Der resultierende Komplex aus Cas9 und tracrRNA:crRNA bindet an der fremden Nukleinsäure mit passender Sequenz zur crRNA und angelagerter PAM-Sequenz. Die Cas9-Nukleasen schneiden im Folgenden beide DNA-Stränge, sodass die fremde Nukleinsäure in der Zelle fragmentiert und abgebaut wird.

1.4.4 CRISPR/Cas9 als Werkzeug der Molekulargenetik

Der in Bakterien und Archaeen enthaltene Mechanismus zur adaptiven Immunantwort gegenüber fremder Nukleinsäure wird in der Molekulargenetik als präzises Werkzeug zur Modifikation von DNA eingesetzt. Die Sekundärstruktur des crRNA:tracrRNA-Komplexes erzeugt Basenpaarungen der 22 nt der crRNA am 3'-Ende mit den Basen am 5'-Ende der tracrRNA (Jinek *et al.*, 2012). Dadurch sind 20 Basenpaare am 5' Ende der crRNA frei zur Anlagerung an die DNA (Jinek *et al.*, 2012). Weiterhin zeigten Jinek *et al.* (2012), dass durch ein einzelnes Transkript aus crRNA und tracrRNA bei Vorhandensein von Cas9 ein spezifisches DNA-Fragment abgebaut wurde. Seitdem wurde das CRISPR/Cas9-System mit artifiziellen crRNA:tracrRNA sowie mit einer ca. 20 Nukleotid langen Target-Sequenz (Zielsequenz) gekoppelt und sowohl in menschlichen Zellen als auch in Säugetieren und Pflanzen erfolgreich angewendet (Doudna *et al.*, 2014). Für Bäume berichteten Fan *et al.* (2015) erstmalig über eine CRISPR/Cas9-induzierte Genom-Editierung in *P. tomentosa*. Mittels CRISPR/Cas9 lassen sich Doppelstrangbrüche an spezifischen Sequenzen generieren, die zu Veränderungen im Genom führen können. Der Vorteil dieser Methode ist, dass jede beliebige Sequenz des Genoms als Target-Sequenz dienen kann, solange eine PAM-Sequenz vorhanden ist. Die in einen Organismus eingebrachte Cas9-Nuklease ist so lange inaktiv, bis gRNA (bestehend aus der Target-Sequenz sowie der crRNA:tracrRNA) sich an die Nuklease anlagert (Song *et al.*, 2016). Im Folgenden wird die gesamte DNA nach einer PAM-Sequenz mit passender komplementärer Sequenz zur Target-Sequenz abgesucht (Song *et al.*, 2016). An der Target-Sequenz mit passender PAM-Sequenz wird durch die Cas9-Nuklease ein Doppelstrangbruch generiert (Song *et al.*, 2016). Die entstandenen Doppelstrangbrüche werden durch zelleigene Reparaturmechanismen entweder durch nicht-homologe Endverbindung zweier Nukleinsäurestränge (NHEJ) oder durch homologe Rekombination wieder zusammengefügt (Nemudryi *et al.*, 2014). Während bei der homologen Rekombination ein gewünschtes Zielfragment an die Bruchstelle eingefügt werden kann,

1 Einleitung

können bei der NHEJ-Reparatur Mutationen in Form von Deletionen und Insertionen an der Buchstelle vorkommen (Nemudryi *et al.*, 2014). Durch die Insertion oder Deletion von Einzelnukleotiden kann es zu einem *Frameshift* (Verschiebung) im Leseraster der mRNA kommen. Eine Verschiebung der Nukleotide hat zur Folge, dass die aus drei Basen bestehenden Aminosäuren einen anderen Code tragen, sodass andere Aminosäuren kodiert werden oder sogar ein vorzeitiges Stopcodon erzeugt wird. Wird eine andere als die ursprüngliche Aminosäure kodiert, die sich zudem noch in ihren Eigenschaften unterscheidet, kann die Struktur des Proteins beeinflusst werden. Durch die Veränderung einer Aminosäure kann somit die Faltungsstruktur eines Proteins oder gegebenenfalls eines Enzyms beeinflusst werden. In Abhängigkeit von der Position der Veränderung kann das Protein möglicherweise funktionsunfähig sein. Sind beispielsweise aktive Zentren von Enzymen betroffen, kann das zugehörige Substrat nicht binden. Wenn wichtige Domänen von Proteinen nicht mehr die ursprüngliche Struktur aufweisen, kann ein Zusammenspiel mit anderen Komponenten der Zelle verhindert sein. Eine Veränderung eines Einzelnukleotides kann auch ohne Effekt auf die Aminosäuresequenz einhergehen, wenn weiterhin für die gleiche Aminosäure kodiert wird.

Weitaus drastischer sind die Folgen der Ausbildung eines vorzeitigen Stopcodons, das den Abbruch der Proteinsynthese bewirkt. Dabei können Proteine erzeugt werden, die im besten Fall lediglich eine Verschwendung von Energie, im schlechtesten Fall schädlich für die Zelle sind (Maquat, 1995). Je dichter das vorzeitige Stopcodon am Startcodon liegt, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit an reduzierter mRNA (Maquat 1995). Die vorzeitigen Stopcodonen können spezifische Mechanismen in einem abweichenden RNA-Metabolismus initiieren (Maquat 1995). Der Abbau fehlerhafter mRNA mit vorzeitigen Stopcodonen wird als *Nonsense-mediated decay* (NMD) bezeichnet (Isshiki *et al.*, 2001). Isshiki *et al.* (2001) zeigten, dass in Reis NMD bei gespleißten mRNAs mit vorzeitigem Stopcodon zu finden waren, jedoch nicht bei teilweise gespleißten RNAs die ebenfalls ein vorzeitiges Stopcodon enthielten. Weiterhin beobachten Isshiki *et al.* (2001), dass vorzeitige Stopcodonen, die in einem Intron vorhanden waren, nicht vom NMD-System registriert wurden. Van Hoof *et al.* (1996) zeigten, dass die Position des vorzeitigen Stopcodons die Stabilität der erzeugten mRNA beeinflusst. Messenger RNAs die bei 20 %, 40 % und 60 % der mRNA ein vorzeitiges Stopcodon trugen, waren instabil und wurden abgebaut, während Stopcodonen bei 80 % der mRNA des Gens zu einer mit dem Wildtyp vergleichbaren Stabilität erzeugten (Isshiki *et al.*, 2001). Wenn durch CRISPR/Cas9 ein Gen verändert werden soll, sodass kein funktionales Protein entsteht, sollte die Target-Sequenz in einem Exon möglichst vor den wichtigen

Domänen des Proteins und im Anfangsbereich der kodierenden Sequenz liegen, damit die erzeugte mRNA über das NMD-System abgebaut wird.

1.4.5 Genom-Editierung bei Bäumen

Die spezifische Genomveränderung der DNA kann anhand von CRISPR/Cas9 erzeugt werden und zielt anders als frühere Methoden direkt auf die Veränderung der genomischen DNA (gDNA) und nicht auf RNA (Bruegmann und Fladung, 2019). Zur Erzeugung einer genomischen Veränderung ist das Wissen über das Genom der zu verändernden Spezies essentiell (Bruegmann und Fladung, 2019). Das Genom der Pappel wurde bereits vollständig sequenziert (Tuskan *et al.*, 2006) und dient daher als ein wichtiger Modellorganismus zur Genommodifikation. Vorteilhaft an der CRISPR/Cas9-Technik ist, dass gezielt bestimmte Mutationen im Genom eingebracht werden können, ohne dass diese Pflanzen von Pflanzen aus der Kreuzungszüchtung unterschieden werden können (Bruegmann und Fladung, 2019). Ein weiterer Vorteil von Genommodifikationen mittels CRISPR/Cas9, TALEN und Zinkfinger-Nukleasen besteht in der gezielten Modifikation von Genen, die über Kreuzungen nicht modifiziert werden können (Osakaba *et al.*, 2016). Außerdem können die Züchtungszeiten, die bei Bäumen sehr lang sind, reduziert werden (Osakaba *et al.*, 2016). Eine durch CRISPR/Cas9-induzierte Modifikation der *Phytoene Desaturase*, die einen Albino-Phänotyp zur Folge hat, wurde erfolgreich in Zitrusgewächsen, Apfel, Traube, Maniok, Kaffee und Kiwi erzielt (Bweg *et al.*, 2018). Fan *et al.* (2015) verwendeten das in der Carotinoid-Biosynthese involvierte *Phytoene Desaturase*-Gen und konnten durch die Modifikation in der Pappel sowohl heterozygot als auch homozygot modifizierte transgene Regenerate erzeugen. Zhuo *et al.* (2015) genierten durch CRISPR/Cas9-vermittelte Modifikationen in Pappeln in den Genen *4CL1* (involviert in die Ligninbiosynthese) und *4CL2* (involviert in Flavonoidbiosynthese). Ding *et al.* (2020) verwendeten ebenfalls das *Phytoene Desaturase* Gen zur CRISPR/Cas9-Modifikation des Pappelhybrids *P. dividiana* × *P. bolleana*. Weiterhin wurden mit CRISPR/Cas9-induzierte Modifikationen in Pappeln für die Gene *SOCI* (*Suppressor of overexpression of constans1*) und *FUL* (*Fruitfull*) sowie *TOZ19* (*tormozembryo defective 19*) (Bruegmann *et al.*, 2019), außerdem *LEAFY* und *AGAMOUS* (Elorrigia *et al.*, 2018) berichtet. Eine Modifikation in *STERIL APETALA* (*SAP*) konnte in *P. tremula* × *P. tremuloides* und *P. tremula* × *P. alba* generiert werden (Azeze und Busov, 2021), weiterhin berichteten Muhr *et al.* (2018) von einer durch CRISPR/Cas9 erzeugten Modifikation in den Pappel-Orthologen *BRANCHED1* (*BCR1*) und *BRANCHED2* (*BCR2*) in *P. × canescens*. Die Geschlechtsdetermination in Pappel erfolgt über das zu *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 17* (*ARR17*) orthologe Gen, das, wenn es

exprimiert wird, die Ausbildung weiblicher Blüten bestimmt (Müller et al., 2020). Müller *et al.* (2020) konnten zeigen, dass weibliche Pappeln nach Ausschalten von *ARR17* durch CRISPR/Cas9 männliche Blüten ausbilden.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Symbiose und die Resistenz bzw. Anfälligkeit gegenüber pilzlichen Organismen wird über Lysin-Motiv-Rezeptor-ähnliche Kinasen (LysM-RLK) vermittelt. In verschiedenen Organismen nehmen diese Kinasen unterschiedliche Funktionen ein. Insbesondere die „*Nodulin-Factor-Perception*“ (*NFP*)-Gene sind bei der Ausbildung einer Symbiose mit stickstofffixierenden Bakterien von Bedeutung. Welche Funktion die LysM-RLKs, die strukturell den Lysin-Motiv-Rezeptor Kinasen der Leguminosen ähneln, in der Pappel bei der Ausbildung einer Symbiose einnehmen, oder ob diese in die Ausbildung einer Resistenz bzw. Anfälligkeit gegenüber *Melampsora spec.* involviert sind, ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Hierzu wurden zu Beginn der Arbeit folgende Thesen aufgestellt:

1. Die LysM-RLK-Kandidatengene sind an der Ausbildung einer Symbiose mit mykorrhizierenden Pilzen beteiligt.
2. Den LysM-RLK-Kandidatengen kommt eine Funktion bei der Ausbildung einer Resistenz oder Anfälligkeit gegenüber *Melampsora spec.* zu.

Zur Analyse der Funktion der gewählten Kandidatengene, sollten Pappeln mittels CRISPR/Cas9 in den Kandidatengen modifiziert werden. Nach einer Auswahl von Linien, die sich in der Modifikation der Kandidatengene unterscheiden (Einzel-, Doppel- oder Dreifachmodifikation), sollte die Funktion der Gene in Mykorrhizierungsversuchen und Infektionsversuchen mit *Melampsora spec.* untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Laborgeräte

Die verwendeten Laborgeräte sowie deren Hersteller sind in Tabelle 2.1 gelistet

Tabelle 2.1 Verwendete Laborgeräte

Angegeben sind das verwendete Laborgerät, die Bezeichnung und der Hersteller. D: Deutschland.

Laborgerät	Bezeichnung	Hersteller
Autoklav	LABAUTOKLAV 25	SHP Steriltechnik AG (Schloss Detzel, D)
Autoklav	Varioklav Dampfsterilisator	H + P Labortechnik (München, D)
Bioanalyser	Aligent 2100	Aligent Technologies (Santa Clara, USA)
Glasperlensterilisator	Steri350	Simon Keller AG (Burgdorf, Schweiz)
Heiz-Thermo-Mixer	HLC	HLC BioTech (Bovenden, D)
Heiz-Thermo-Mixer	Mixing Block MB	Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd (Hangzhou, China)
Homogenisator	Bead Ruptor Elite OMNI International	BioLabProducts (Bebensee, D)
Hybridisierungsinkubator	GFL 3032	Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel, D)
Imaging System	ChemStudio PLUS	Analytic Jena (Jena, D)
Inkubator	Wise Cube	Witeg Labortechnik GmbH (Wertheim, D)
Klimaschrank	Weiss Klimaschrank	Weiss Umwelttechnik GmbH (Reiskirchen, D)
Kühlbrutschank	BK600 Sorvall Heraeus	Kendro Laboratory Products GmbH (Hanau, D)
Magnetrührer	Cimarec i Poly Komet	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Mikrowelle	Inverter NN-SD452W	Panasonic (Kadoma, Japan)
PCR-Werkbank	DNA/RNA UV Cleaner UVT-S-AR	Kisker Biotech GmbH & Co. KG (Steinfurt, D)
Photometer	BioPhotometer 6131	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH (Hamburg, D)
Photometer	Spektrophotometer	peqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen, D)
Photometer	NanoDrop One ^c	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Präzisions-pH/mv-Meter	WTW pH 521	Wissenschaftliche Technische Werkstätten GmbH (Weilheim, D)
Real-Time-Thermocycler	C-1000 Touch Thermal Cycler CFX96 TM Real-Time System	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Schüttelwasserbad	GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel, D)
Schüttler	IKA [®] KS 260 basic	IKA [®] -Werke GmbH & Co.KG (Staufen, D)
Schwingmühle	Retsch MM300	Retsch GmbH (Haan, D)
Spannungsquelle	PHERO-Stab 500	BioTec-Fischer (Reiskirchen, D)
Sterilwerkbank	SCANLAF Mars Safety Class 2	LaboGene (Lynge, Dänemark)
Sterilwerkbank	Herasafe Typ KS12	Kendro (Langenselbold, D)
Sterilwerkbank	Heraeus Instruments Lamin Air [®] HV 2448	Holten Lamin Air AS (Allerød, Dänemark)
Taumelschüttler	Biometra WT12	Biometra GmbH (Göttingen, D)

Fortsetzung Tabelle 2.1

Thermocycler	SensoQuest	biolab products (Göttingen, D)
Trocken Bad Inkubator	Dry Bath Incubator	DEELUX Labortechnik GmbH (Gödenstorf, D)
Trockenschrank	Heraeus Typ SUT 6200	Heraeus, (Hanau D)
UV-Crosslinker	UV-Stratalinker	Stratagene (San Diego, USA)
UV-Dokumentation	Intas [®]	Intas Science Imaging (Göttingen, Deutschland)
Vortex Bioanalyzer	IKA [®] MS3	Jahnke und Kunkel Labortechnik (Staufen im Breisgau, D)
Waage	Kern PCB	Kern & Sohn GmbH (Balingen, D)
Waage	Statorius	Statorius GmbH (Göttingen, D)
Wachstumsschrank	RUMED [®] 1601	Rubarth Apparate GmbH (Laatzen, D)
Zentrifuge	Sprout	Biozym Scientific GmbH (Oldendorf, D)
Zentrifuge	Mikro220R	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, D)
Zentrifuge	Heraeus Fresco 21 Centrifuge	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Zentrifuge	Heraeus Pico Biofuge	Kendro Laboratory Products GmbH (Hanau, D)
Zentrifuge	Heraeus Pico 17	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Mikroskop	Olympus BH-2	Olympus Life Science (Hamburg, D)
Stereomikroskop	Stemi 2000 – C	Carl Zeiss (Oberkochen, D)

2.2 Enzyme und Chemikalien

Die Chemikalien mit dem Reinheitsgrad zur Analyse wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Duchefa Biochemie (Haarlem, Niederlande), Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Sigma-Aldrich (München, Deutschland) bezogen.

Von Thermo Scientific (Waltham, USA) oder Biolabs ©Inc (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) wurden die verwendeten Enzyme erworben. Die DSC-Taq-Polymerase wurde vom DNA-Cloning-Service (Hamburg, Deutschland) bezogen.

Die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten in der Agarosegelelektrophorese erfolgte durch die SmartLadder (Eurogentec, Belgien) mit einem Bereich von 200–10000 bp. In den Southern-Blot-Analysen wurde die Größen von DNA-Fragmenten durch den DNA Molecular Weight Marker II mit einem Bereich von 125–23130 bp (Roche, Schweiz) bestimmt.

2.3 Molekularbiologische Kits

Die zur molekulargenetischen Analyse verwendeten Kits sind in Tabelle 2.2 aufgeführt. Deren Anwendung erfolgte, wenn nicht anders vermerkt, nach Herstellerangaben.

Tabelle 2.2: Auflistung der verwendeten molekularbiologischen Kits

Erfasst sind die verwendeten molekularbiologischen Kits und deren Anwendung. D: Deutschland.

Molekularbiologisches Kit	Anwendung
innuMIX qPCR DSGreen Standard (Analytik Jena, Jena, D)	PCR-Mix zu quantitativen Expressionsanalyse
innuPREP Plant DNA-Kit (Analytik Jena, Jena, D)	Aufreinigung von DNA nach Isolation mittels der BoMAB-Methode
innuPREP-DOUBLEpure Kit (Analytik Jena, Jena, D)	Elution von PCR-Fragmenten nach Auftrennung im Agarosegel
On-column DNase Digestion Set (Sigma-Aldrich, München, D)	DNase-Verdau auf der Säule des Spectrum™ Plant Total RNA Kits
RNeasy Mini Elute Cleanup Kit (Qiagen, Hilden, D)	Aufreinigung der RNA-Proben nach DNase Verdau
RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, D)	RNA-Isolation aus Pflanzenmaterial
Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, München, D)	RNA-Isolation aus Pflanzenmaterial
Turbo-DNA-free™ Kit (Thermo Fischer Scientific/ Ambion, Waltham, USA)	DNase-Verdau von RNA-Proben

2.4 Gewebekultur

In der Gewebekultur wurden grundsätzlich sterilisierte Werkzeuge und Materialien verwendet. Medien wurden im Autoklav (Varioklav Dampfsterilisator, H + P Labortechnik München, Deutschland) bei einer Temperatur von auf 121 °C über einen Zeitraum von 20 min sterilisiert. Die für die Gebekultur verwendeten Instrumente wie Pinzetten, Scheren, Spatel wurden, nach vorheriger Desinfektion, im Glasperlensterilisator (Steri350, Simon Keller AG, Burgdorf, Schweiz) bei 250 °C für ca. 10 s sterilisiert. Die Arbeiten in der Gewebekultur erfolgten ausschließlich an den zuvor mit 70%igen vergälltem Alkohol desinfizierten Sterilwerkbänken.

2.4.1 Standard-Medium 460

Zur Pflanzenanzucht wurde das 460-Medium bestehend aus McCown Woody Plant Medium (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande; Abkürzung: WPM-Medium) genutzt. Die weiteren verwendeten Medien wurden auf Basis des 460-Mediums angesetzt. Vor der Verwendung wurde das 460-Medium durch Autoklavieren bei 121 °C für 20 min sterilisiert und anschließend kühl gelagert.

460-Medium	
2,6 g	Woody-Plant Medium
20 g	Sucrose
ad. 1 L	ddH ₂ O
	pH 5,8
6–7 g	Agar (Festmedium)

2.4.2 Regenerationsmedium 601

Das 601-Regenerationsmedium setzt sich aus autoklaviertem 460-Medium, versetzt mit 100 mg/mL Pluronic F68 (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) und 0,0022 mg/L Thidiazuron (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande) zusammen. Thidiazuron ist ein Diphenylharnstoff, der zahlreiche cytokinähnliche Reaktionen induzieren und die Pflanzenregeneration fördern kann (Thomas *et al.*, 1986). Daher wurde das 601-Medium insbesondere für die Regeneration von pflanzlichen Explantaten nach der Agrobakterienvermittelten Transformation verwendet. Zur Selektion transgener Explantate wurden dem 601-Medium je nach verwendetem Transformationsvektor ein oder mehrere Antibiotika zugefügt. Das Antibiotikum Cefotaxim (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande) wurde standardmäßig zunächst jedem Selektionsmedium nach einer Transformation hinzugefügt, um eine Vermehrung der Agrobakterien zu verhindern.

2.4.3 Anzucht von Pappelklonen

Die Vermehrung verschiedener Pappelklone erfolgte in der Gewebekultur unter sterilen Bedingungen über Kopfstecklinge. Von der Ausgangspflanze wurden ca. 1–2 cm große Kopfstecklinge, die aus dem oberen Teil der Pflanze mit ein bis zwei Blättern bestand, entnommen. Die folgenden Blätter wurden entfernt, sodass der Stiel in das neue Medium, standardmäßig 460-Medium, umgesetzt werden konnte. Zur Erhaltung wurden in regelmäßigen Abständen von 4–6 Wochen, Kopfstecklinge in neues Medium gesteckt. Zusätzlich konnten Zwischenstücke des Sprosses zur Vermehrung von Pflanzenmaterial in neues Medium umgesetzt werden, sodass sich aus den Blattachsen neue Triebe bildeten. Zudem konnte das 601-Regenerationsmedium zur Vermehrung von Pflanzenmaterial verwendet werden, da das in dem Medium enthaltene Thidiazuron die Zellteilung in pflanzlichem Gewebe anregt und bei Stecklingen zu mehrfacher Triebbildung führt.

2.4.4 Verwendete Pappelklone

Verschiedene Pappelklone unterschiedlicher Sektionen wurden auf ihre Resistenz oder Anfälligkeit gegen zwei Pappelrostarten (*Melampsora spec.*) untersucht. Die für Infektionsversuche mit *Melampsora spec.* verwendeten Pappelklone sind in Tabelle 2.3 gelistet. Die durch Transformation erzeugten Pappellinien sind in Tabelle 2.4 aufgeführt. Der Pappelklon INRA 717-1B4 (*P. × canescens*) wird im Folgenden als P1 bezeichnet, die Kandidatengene Potri.005G128400 (*NFP-like1*), Potri.007G032300 (*NFP-like2*), Potri.008G160600 (*NFP-like3*) und Potri.010G078700 (*NFP-like4*) als *NFP-like1* bis *NFP-*

2 Material und Methoden

like4 benannt. Die für die Infektionsversuche mit *Melampsora larici-tremulae* verwendeten transgenen Pappellinien sind in Tabelle 2.5 angegeben.

Tabelle 2.3: Verwendete Pappelklone zur Analyse der Anfälligkeit oder Resistenz gegenüber *Melampsora spec.*

Angegeben sind die Namen der Linien, die zugehörige Sektion und die Art/der Hybrid. Die Information bezüglich der Art/des Hybrides wurde durch persönliche Mitteilung von Anke Schellhorn, Thünen Institut für Forstgenetik, Großhansdorf erhalten oder aus Lührs *et al.* (2015) und BLE 2019 entnommen.

Sektion (Eckenwalder, 1996)	Name	Art/Hybrid
<i>Aigeiros</i>	Aue2	<i>P. deltoides</i> × <i>P. nigra</i>
<i>Aigeiros</i>	D25	<i>P. deltoides</i>
<i>Aigeiros</i>	DN1	<i>P. deltoides</i> × <i>P. nigra</i>
<i>Aigeiros</i>	DN5	<i>P. deltoides</i> × <i>P. nigra</i>
<i>Aigeiros</i>	P7	<i>P. nigra</i>
<i>Aigeiros/Tacamahaca</i>	Max1	<i>P. nigra</i> × <i>P. maximowiczii</i>
<i>Tacamahaca/Aigeiros</i>	Rochester	<i>P. maximowiczii</i> × <i>P. nigra</i> var. <i>Plantierensis</i>
<i>Populus</i>	4x Göttingen	<i>P.</i> × <i>canescens</i> tetraploid (<i>P. tremula</i> × <i>P. alba</i>)
<i>Populus</i>	Astria	<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i> triploid
<i>Populus</i>	Brauna11	<i>P. tremula</i>
<i>Populus</i>	Esch5	<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>
<i>Populus</i>	P1 (INRA 717-1B4)	<i>P.</i> × <i>canescens</i> (<i>P. tremula</i> × <i>P. alba</i>)
<i>Populus</i>	T89	<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>
<i>Populus</i>	Villafranca	<i>P. alba</i>
<i>Populus</i>	W52	<i>P. tremula</i>
<i>Tacamahaca</i>	Androscoggin NW7-G22X	<i>P. maximowiczii</i> × <i>P. trichocarpa</i>
<i>Tacamahaca</i>	Muhle Larsen NW7-1975	<i>P. trichocarpa</i>
<i>Tacamahaca</i>	Nisqually	<i>P. trichocarpa</i>
<i>Tacamahaca</i>	Weser4 NW7-735G	<i>P. trichocarpa</i>
<i>Tacamahaca</i>	Weser6 NW7-737K	<i>P. trichocarpa</i>

Tabelle 2.4: Erzeugte transgene Pappellinien

Angegeben ist der für die Transformation verwendete Pappelklon, die Agrobakterien-Klone sowie die Verwendung der T-DNA des Transformationsvektors und die Benennung der durch Transformation erzeugten transgenen Linien.

Ursprungslinie	Agrobakterium-Klon	Verwendung	Transformation
<i>P. × canescens</i> (P1) INRA 717-1B4	A259	Erzeugung von CRISPR/Cas9-vermittelten Modifikationen in <i>NFP-like1</i> und <i>NFP-like2</i>	N481
	A260	Erzeugung von CRISPR/Cas9-vermittelten Modifikationen in <i>NFP-like3</i> und <i>NFP-like4</i>	N482, N489, N494
	A259 und A260	Erzeugung von CRISPR/Cas9-vermittelten Modifikationen in <i>NFP-like1</i> , <i>-like2</i> , <i>-like3</i> und <i>-like4</i>	N483, N484

Tabelle 2.5: Transgene Pappellinien

Angegeben sind die verwendeten transgenen Pappellinien, die zur Analyse veränderter Anfälligkeit oder Resistenz gegenüber *Melampsora larici-tremulae* eingesetzt wurden sowie das modifizierte Gen.

Ursprungslinie	Transformationsnummer	Modifiziertes Gen	Bezeichnung
<i>P. × canescens</i> (P1) INRA 717-1B4	N481	<i>NFP-like1</i>	N481-2
		<i>NFP-like1</i>	N481-9
		<i>NFP-like1</i>	N481-15
		<i>NFP-like1</i>	N481-23
		<i>NFP-like1</i>	N481-33
		<i>NFP-like1</i>	N481-44
		<i>NFP-like1</i>	N481-97
	N482	<i>NFP-like3</i> , <i>-like4</i>	N482-24
		<i>NFP-like3</i> , <i>-like4</i>	N482-47
	N483	<i>NFP-like1</i> , <i>-like3</i> , <i>-like4</i>	N483-8
	N484	<i>NFP-like1</i> , <i>-like3</i> , <i>-like4</i>	N484-3
		<i>NFP-like1</i> , <i>-like3</i> , <i>-like4</i>	N484-6

2.5. Agrobakterien

Alle zur Transformation von des Pappelklons INRA 717-1B4 (P1) verwendeten Agrobakterien-Klone basierten auf *Agrobacterium tumefaciens* des Stammes GV3101::pMP90RK. Agrobakterien mit den gewünschten Vektoren wurden vom DNA-Cloning-Service (Hamburg, Deutschland) bezogen. Die für die Transformation verwendeten Agrobakterien-Stämme sind derart modifiziert, dass die T-DNA des Agrobakterium-Plasmids entfernt ist und sich auf diesem nur die Virulenzgene befinden, die für die Integration in das pflanzliche Genom notwendig sind (Hellens *et al.*, 2000). Die in das pflanzliche Genom zu integrierende T-DNA befindet sich auf einem zweiten (binären) Vektor. Die verwendeten

Transformationsvektoren zur Agrobakterien-vermittelten Transformation sind in Tabelle 2.4 gelistet.

2.5.1 Medien zur Agrobakterienanzucht

Alle Medien wurden vor ihrer Verwendung durch Autoklavieren bei 121 °C für 20 min sterilisiert und anschließend kühl gelagert. Nach dem Autoklavieren wurde dem YEB-Medium 2 mL steriles 1 M MgSO₄ hinzugegeben.

Lauria-Bertani (LB)-Medium		YEB-Medium	
10 g	Trypton	5 g	Fleischextrakt
5 g	Hefeextrakt	5 g	Hefeextrakt
10 g	NaCl	5 g	Pepton
ad.1 L	ddH ₂ O	5 g	Saccharose
	pH 7	ad. 1 L	ddH ₂ O
15 g	Agar (Festmedium)		pH 7.2
		15 g	Agar (Festmedium)

2.5.2 Glycerol-Stocklösungen

Zur Lagerung der Agrobakterien, die die gewünschten Ti-Plasmide und Transformationsvektoren enthielten, wurde eine Einzelkolonie in YEB-Selektionsmedium angeimpft und über Nacht bei 28 °C und 200 rpm (IKA® KS 260 basic, IKA®-Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Deutschland) geschüttelt. Am Folgetag wurden 800 µL der Agrobakterienkultur entnommen und mit 200 µL sterilen Glycerin (99,5 %) versetzt, gut durchmischt und mittels flüssigen Stickstoffs schockgefroren. Die Glycerol-Stocklösungen wurden bei -80 °C gelagert.

2.6 Transformationsvektoren

Zur CRISPR/Cas9-induzierten Modifikation in den paralogen Kandidatengen *NFP-like1* und *NFP-like2* sowie *NFP-like3* und *NFP-like4* wurden zwei verschiedene Transformationsvektoren verwendet (Tabelle 2.6). Die verwendeten Vektoren wurden, wenn nicht anders angegeben, vom DNA-Cloning-Service (Hamburg, Deutschland) bezogen. Im Transformationsvektor des Agrobakterienklons A259 waren zwei gRNAs für zwei Targetbereiche in *NFP-like1* und *NFP-like2* vorhanden. Der in dem Agrobakterienklon A260 enthaltene Transformationsvektor wies zwei gRNAs für zwei Targetbereiche in *NFP-like3* und *NFP-like4* auf. Die Transformationsvektoren unterschieden sich außerdem in den in der T-DNA enthaltenden Resistenzkassetten, die T-DNA des Vektors C234p6ioR-35sCasWToi-

2 Material und Methoden

P57 (A259) trug eine Hygromycin-Resistenzkassette, während die T-DNA des Vektors C235p9ioR-35sCasWToi-P810 (A260) eine Kanamycin-Resistenzkassette aufwies.

Beide Vektoren enthalten die genetische Information für die Cas9-Nuklease aus *Streptococcus pyogenes* sowie die jeweils an das zu modifizierende Gen angepasste gRNA (Anhang Abschnitt 6.3). Die Target-Sequenzen für die gRNAs wurden vom DNA-Cloning-Service (Hamburg, Deutschland) auf Grundlage der CDS (*coding sequence*) gewählt, sodass die Modifikation in Exons erfolgte. Die Vektorkarten für beide Transformationsvektoren sind im Anhang unter dem Abschnitt 6.2 hinterlegt.

Tabelle 2.6: Auflistung der verwendeten Vektoren

Angegeben sind Vektorbezeichnung und der zugehörige Agrobakteriumklon, der den Vektor trägt. Ferner die Verwendung des Vektors nach Transformation in das Pappelgenom.

Vektorbezeichnung	Agrobakteriumklon	Verwendung
C234p6ioR-35sCasWToi-P57	A259	Erzeugung von CRISPR/Cas9-vermittelten Modifikationen in <i>NFP-like1</i> und <i>NFP-like2</i>
C235p9ioR-35sCasWToi-P810	A260	Erzeugung von CRISPR/Cas9-vermittelten Modifikationen in <i>NFP-like3</i> und <i>NFP-like4</i>

2.6.1 CRISPR/Cas9-gRNAs

Zur funktionellen Analyse der Lysin-Motiv-Rezeptor-ähnliche Kinasen (LysM-RLKs), die vermutlich an der Ausbildung der Symbiose beteiligt sind, wurde die CRISPR/Cas9-Technik verwendet, um eine Veränderung in den zu untersuchenden Genen zu erzeugen. Durch eine potentielle Veränderung sollte die Funktionsfähigkeit des resultierenden Proteins vermindert werden. Im Idealfall wird das Protein durch die erzeugte Veränderung nicht synthetisiert. Zur Modifikation wurden Exons als Target-Sequenzen gewählt, da sich die Veränderungen direkt auf das zu prozessierende Protein auswirken. Auf Grund der Genomduplikation in Pappel (Tuskan *et al.*, 2006) liegen zahlreiche Gene, wie auch die Kandidatengene, in zweifacher Kopienzahl vor. Paraloge Paare bilden *NFP-like1* (Potri.005G128400) und *NFP-like2* (Potri.007G032300) (*NFP-like2*) sowie *NFP-like3* (Potri.008G0160600) und *NFP-like4* (Potri.010G078700). Eine Modifikation durch die Cas9-Nuklease sollte für eine aussagekräftige Funktionsanalyse in beiden Genen erfolgen, da das jeweilige paraloge Gen die Funktion des nicht mehr funktionsfähigen zweiten Gens übernehmen kann. Um die Wahrscheinlichkeit einer Modifikation in den jeweiligen genomischen Sequenzen des zu untersuchenden Gens zu erhöhen, wurden Transformationsvektoren mit zwei gRNAs gewählt (Abbildung 2.1). Die gRNAs werden zur besseren Verständlichkeit im weiteren Verlauf wie folgt bezeichnet: gRNA1: gRNA-Target 1 in *NFP-like1* und *NFP-like 2*; gRNA2: gRNA-

2 Material und Methoden

Target 2 in *NFP-like1* und *NFP-like 2*; gRNA3: gRNA-Target 1 in *NFP-like3* und *NFP-like 4*; gRNA4: gRNA-Target 2 in *NFP-like3* und *NFP-like 4*.

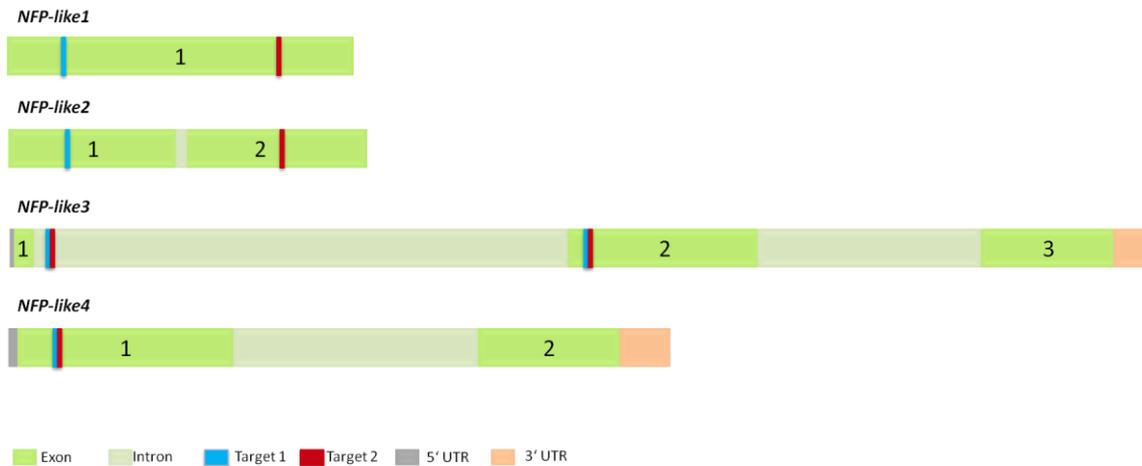


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der genomischen Sequenz der *NFP-like*-Gene

Schematische Darstellung der genomischen Sequenz anhand der Annotation aus Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!search?show=KEYWORD>, Zugriff 09.01.2019). Dargestellt sind neben Exons und Introns, soweit annotiert, die UTR-Regionen und die jeweiligen Positionen der gRNA-Targets, die für die CRISPR/Cas9-Modifikation verwendet wurden.

Zum Nachweis einer möglichen Modifikation in den Kandidatengen wurden die gewünschten Fragmente mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (2.9.2) amplifiziert. In Tabelle 2.7 sind die internen Nummern der verwendeten Oligonukleotide zum Nachweis der Modifikation in den Kandidatengen aufgeführt. Die Oligonukleotide wurden auf Grundlage der *P. trichocarpa*-Sequenz erstellt und für die Analysen verwendet. Anhand der aus dieser Polymerase-Ketten-Reaktion resultierenden Daten wurden die putativ transgenen und modifizierten Regenerate auf Grundlage ihrer Modifikation in den Kandidatengen für die weiteren Analysen selektiert.

Tabelle 2.7: Oligonukleotide zur Amplifikation der gRNA-Bereiche

Angegeben sind die gewählten Oligonukleotide anhand ihrer laufenden internen Nummerierung zur Analyse einer Modifikation im Zielbereich der gRNA der Kandidatengene. T_A: Annealing-Temperatur.

Oligonukleotid	Fragmentgröße	T _A	Zielgen	Target
#2257 + #2260	1794 bp	60 °C	<i>NFP-like1</i>	gRNA1 und gRNA2
#2267 + #2268	810 bp	61,1 °C	<i>NFP-like3</i>	gRNA3 und gRNA4
#2269 + #2270	623 bp	52,5 °C	<i>NFP-like4</i>	gRNA3 und gRNA4

Die in Tabelle 2.7 angegebenen und für die erste Selektion der transgenen Regenerate verwendeten Oligonukleotide wiesen Sequenzunterschiede zu den in *P. × canescens* (P1) vorhandenen Allelen von *P. tremula* und *P. alba* auf, sodass teilweise nur eines der beiden

2 Material und Methoden

Allele amplifiziert wurde. Zum Nachweis der genetischen Information für beide Allele der selektierten Linien wurden daraufhin neue Oligonukleotide verwendet (Tabelle 3.2). Bei diesen Oligonukleotiden wurden spezifisch Bereiche gewählt, die in beiden Allelen von P1 identisch sind oder zwei verschiedene Oligonukleotidpaare für beide Allele erzeugt. Alle zu diesem Zeitpunkt bereits verworfenen Regenerate konnten nicht erneut auf das noch fehlende Allel getestet werden.

Tabelle 2.8: Spezifische Oligonukleotide zur Amplifikation der gRNA-Bereiche in P1

Angegeben sind die gewählten Oligonukleotide anhand ihrer laufenden internen Nummerierung zur Analyse einer Modifikation im Zielbereich der gRNA der Kandidatengene. T_A: Annealing Temperatur.

Oligonukleotid	Fragmentgröße	T _A	Zielgen	Target
#2721 + #2722	565 bp	58 °C	<i>NFP-like1</i> Alba	gRNA1
#2723 + #2771	561 bp	58 °C	<i>NFP-like1</i> Tremula	gRNA1
#2677 + #2678	691 bp	54 °C	<i>NFP-like1</i>	gRNA2
#2267 + #2330	476 bp	57 °C	<i>NFP-like3</i>	gRNA3 und gRNA4
#2682 + #2683	551 bp	50 °C	<i>NFP-like4</i>	gRNA3 und gRNA4

2.6.2 Effektivität und OFF-Targets der gRNAs

Die gRNAs wurden, wie bereits erwähnt, in genomischen Bereichen gewählt, die in beiden paaralogen Genen identisch sind. Dabei war zu beachten, dass neben der identischen Sequenz für die gRNA-Targets auch eine funktionelle PAM-Sequenz vorhanden war. Weiterhin sollten die gRNA-Targets nach Möglichkeit in unmittelbarer Nähe zueinander lokalisiert sein, in der Annahme, dass der Bereich zwischen den beiden gRNA-Targets herausgeschnitten wird. Die gRNA-Targets wurden ohne eine Überprüfung der Effektivität gewählt. Zahlreiche Parameter können die Effektivität der gRNA beeinflussen (Doench *et al.*, 2014, Wong *et al.*, 2015). Eine Analyse der verwendeten gRNAs wurde durchgeführt und die Ergebnisse bereits in Bruegmann *et al.* (2019) veröffentlicht. Die verwendeten gRNAs sind durch ihre Sekundärstruktur in ihrer Effektivität beeinflusst und weisen geringe Effektivität auf. Die Analyse der Sekundärstrukturen erfolgte mittels des bioinformatischen *Webtools RNA-fold* (Gruber *et al.*, 2008) unter Verwendung des Andronescu-Modells (Andronescu *et al.*, 2007). Die Darstellung der Sekundärstruktur anhand der minimal aufgewendeten Energie (*minimum free energy*: MFE) wurde unter Verwendung des Algorithmus von Zucker *et al.* (1981) umgesetzt.

Mögliche weitere Modifikationspositionen der verwendeten gRNAs im Pappelgenom wurden mit dem bioinformatischen *Webtool* CRISPR-P (Lei *et al.*, 2014) ausgewertet. Das Programm dient zur Auswahl von gRNAs für ein Targetgen mit optimalen Eigenschaften. Die gRNA soll

2 Material und Methoden

möglichst wenige OFF-Targets mit einer geringen möglichen Modifikation (OFF-Score) und eine möglichst effektive gRNA am im Targetgen (ON-Score) aufweisen (Lei *et al.*, 2014). Da die gRNAs vor dieser Analyse bereits gewählt waren, konnte lediglich die Effektivität der gRNAs und die möglichen OFF-Targets bestimmt werden. Die Effektivität der gewählten gRNAs ist in Tabelle 2.7 angegeben. Jede gRNA hat eine weitere gRNA die zu 100 % passend ist, dies liegt dem Zustand zu Grunde, dass zwei Gene simultan modifiziert werden sollten. Als Untersuchungsgrundlage galt das Referenzgenom von *P. trichocarpa* und bedauerlicherweise nicht das Genom von *P. × canescens* (P1). Die möglichen OFF-Targetbereiche wurden im Anschluss auf Grundlage der P1 analysiert und Oligonukleotide zum Nachweis einer möglichen Modifikation in den OFF-Targets erzeugt. Zur Analyse einer Modifikation in den möglichen OFF-Targets wurden 5 transgene Linien und der nicht-transformierte Kontroll-Klon P1 über Polymerase-Ketten-Reaktion im OFF-Target mit der höchsten Modifikationswahrscheinlichkeit analysiert. Der ON-Score kann Werte von 0–1 annehmen und der höhere Wert entspricht dabei einer höheren Effektivität. Die gRNA1 war nach dem ON-Score in der *in silico*-Analyse vermutlich effektiver als die anderen gRNAs, zeigte jedoch für *NFP-like1* die höchste Anzahl an möglichen OFF-Targets. Abstufend in ihrer Effektivität lassen sich die gRNAs wie folgt ordnen:

gRNA1, gRNA2, gRNA4 und gRNA3.

Die gRNAs waren bei Betrachtung eines möglichen Effektivitätsscores von 1 nicht optimal, dies wird ebenso durch die Anzahl möglicher OFF-Targets deutlich. Beispielsweise zeigte gRNA1 für *NFP-like1* insgesamt 138 OFF-Targets an. Keine der gewählten gRNAs hatte weniger als 25 OFF-Targets. Erstaunlich war, dass lediglich bei der Wahl des paralogen Gens, sich die Anzahl der OFF-Targets und der ON-Scores bei gleichen gRNAs unterscheiden.

Für die Position der gRNA in *NFP-like1* und *NFP-like2* zur simultanen Modifikation konnten, unter den gegebenen Bedingungen, nur die Bereiche von gRNA1 und gRNA2 gewählt werden. Die gRNAs wurden auf Grundlage der *P. trichocarpa*-Sequenz erzeugt. Zwei weitere gRNAs wären bei Betrachtung der P1-Sequenzen für die Modifikation in den Kandidatengenen möglich gewesen. Die gRNA3 und gRNA4 für eine simultane Modifikation in *NFP-like3* und *NFP-like4* hätten durchaus anders gewählt werden können, um eine bessere Effektivität zu erreichen. Es wurden alle möglichen PAM-Sequenzen in den Exonbereichen untersucht und anschließend mit CRISPR-P (Lei *et al.*, 2014) analysiert. Zusätzlich zu den zwei gewählten gRNAs wurden noch acht andere mögliche gRNA-Positionen für die Modifikation der Kandidatengene lokalisiert. Leider konnten nur zwei dieser Positionen mit

CRISPR-P analysiert werden, diese zeigten in der *in silico*-Analyse eine deutlich höhere Effektivität als die gewählten gRNAs.

Tabelle 2.9: OFF-Target-Analyse

Angegeben ist der ON-Score der eingesetzten gRNA sowie die Anzahl der möglichen OFF-Targets. Die Analyse erfolgte unter Verwendung des bioinformatischen Programms CRISPR-P (Lei *et al.*, 2014) und auf der Grundlage genomischen Sequenz von *P. trichocarpa*.

gRNA	Targetgen	ON-Score	Anzahl OFF-Targets
gRNA1	<i>NFP-like1</i> + <i>NFP-like2</i>	<i>NFP-like1</i> : 0,1447 <i>NFP-like2</i> : 0,2113	<i>NFP-like1</i> : 138 <i>NFP-like2</i> : 44
gRNA2	<i>NFP-like1</i> + <i>NFP-like2</i>	<i>NFP-like1</i> : 0,0544 <i>NFP-like2</i> : 0,0376	<i>NFP-like1</i> : 63 <i>NFP-like2</i> : 63
gRNA3	<i>NFP-like3</i> + <i>NFP-like4</i>	<i>NFP-like3</i> : 0,0251 <i>NFP-like4</i> : 0,0317	<i>NFP-like3</i> : 25 <i>NFP-like4</i> : 43
gRNA4	<i>NFP-like3</i> + <i>NFP-like4</i>	<i>NFP-like3</i> : 0,0335 <i>NFP-like4</i> : 0,0335	<i>NFP-like3</i> : 100 <i>NFP-like4</i> : 100

2.7. Agrobakterien-vermittelte Transformation von *P. × canescens*

Zur genetischen Modifikation des von *P. × canescens* (P1) wurde die Agrobakterium-vermittelte Transformation verwendet. Bei der Transformation mittels Agrobakterien wird sich die Eigenschaft der Integration von Agrobakterien-DNA in das Genom der Zielpflanze zu Nutze gemacht (Hellens *et al.*, 2000) und erfolgte in Anlehnung an Fladung *et al.* (1997).

2.7.1 Agrobakterien-Vorkultur

Am Abend vor der Transformation wurde die Agrobakterium-Vorkultur angeimpft. Hierzu wurde eine Spatelspitze der Glycerol-Stocklösung der Agrobakterien in 3 mL LB-Medium mit Selektionsantibiotika überführt und über Nacht bei 28 °C und 200 rpm (IKA® KS 260 basic, IKA®-Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Deutschland) geschüttelt. In Abhängigkeit der verwendeten Ti-Plasmide sowie der binären Vektoren wurden unten stehende Antibiotika in den angegebenen Konzentrationen (Tabelle 2.10) dem Medium zugefügt (DNA-Cloning-Service, Hamburg, Deutschland).

Tabelle 2.10: Verwendete Antibiotika zur Selektion der Transformationsplasmide

Gelistet sind die verwendeten Antibiotika und deren Konzentration für die verschiedenen Selektionsziele.

Antibiotikum	Konzentration	Selektion
Rifampicin	100 µg/mL	Agrobakterium GV3101
Gentamycin	50 µg/mL	Ti-Plasmid (pMP90RK)
Kanamycin	50 µg/mL	Ti-Plasmid (pMP90RK)
Spectinomycin	100 µg/mL	Binärer Vektor
Streptomycin	300 µg/mL	Binärer Vektor

2.7.2 Agrobakterien-Hauptkultur

Am Folgetag wurden die 3 mL Agrobakterien-Vorkultur in 100 mL YEB-Medium überführt, bei 28 °C und 200 rpm zu einer Hauptkultur mit der OD₆₀₀ von 0,4 angezogen. Nach Zugabe von 18 µL Acetosyringon (0,1 M) wurde die Agrobakterienkultur für 30 min im Dunkeln bei 28 °C und 200 rpm inkubiert. Währenddessen wurden Stängel und Blattmaterial des zu transformierenden Pappelklons P1 geerntet und mit einem sterilen Skalpell fein zerkleinert. Um ein Austrocknen des Pflanzenmaterials bis zur Zugabe zur Agrobakterienkultur zu verhindern, wurde es in flüssigem 460-Medium gehalten. Das fein zerkleinerte Pappelmaterial wurde 30 min bei 28 °C und einer leichten Schüttelbewegung von 200 rpm in der Agrobakterien-Hauptkultur inkubiert. Nach vorsichtigem Abtupfen des Pflanzenmaterials auf sterilem Filterpapier wurden die Explantate grob auf 460-Medium ausgelegt. Die Expression der *Flagella*-Gene ist in Licht unterdrückt (Oberpichler *et al.*, 2008) und im Dunkeln gehaltene Agrobakterien sind mobiler, haften effektiver an Pflanzenmaterial an und sind virulenter (Oberpichler *et al.*, 2008). Nach der Inkubationszeit von zwei Tagen im Dunkeln wurden die Agrobakterien mit einer Waschlösung (500 mg/L Cefotaxim in sterilem Leitungswasser) vom Pflanzenmaterial entfernt. Das gesamte Pflanzenmaterial wurde fünfmalig in 150 mL der Waschlösung für 2 min geschwenkt. Eine letzte Waschung erfolgte mit sterilem Leitungswasser. Im Anschluss wurde das Pflanzenmaterial von dem sterilen Wasser befreit und vereinzelt auf 601-Medium mit Antibiotika-Selektion ausplattiert.

2.7.2.1 Anpassung der Agrobakterien-Vorkultur und Hauptkultur

Aufgrund von falsch positiven Regeneraten wurde das Transformationsprotokoll dahingehend verändert, dass die Vorkultur in 10 mL YEB-Medium mit der Zugabe von den nötigen Antibiotika erfolgte. Die gesamte Vorkultur wurde am Folgetag in 90 mL YEB-Selektionsmedium überführt und wie eingangs beschrieben bei 28 °C und 200 rpm zu einer OD₆₀₀ von 0,4 angezogen. Alle weiteren Schritte erfolgten wie im vorherigen Absatz erläutert. Die Modifikation des Protokolls sollte verhindern, dass die Agrobakterien während der Inkubation in YEB-Medium die Hilfsplasmide, die für eine erfolgreiche Transformation essentiell sind, durch nicht vorhandenen Selektionsdruck verlieren.

2.7.3 Regeneration und Selektion

Die Regeneration und Selektion der putativ transgenen Regenerate erfolgte auf 601-Medium mit Selektionsdruck in Anhängigkeit des transformierten Plasmides. Die zur Transformation stark zerkleinerten Pappelblätter und -sprosse wurden nach der Vereinzlung eine Woche abgedunkelt im Klimaraum bei 23 °C und 50 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Auf Grund des

2 Material und Methoden

Kontaktes zum antibiotikahaltigen 601-Medium konnten nur die Explantate regenerieren, bei denen die T-DNA mit Resistenzkassette in das Genom integriert wurde. Dem Medium wurde für die Selektion der Linien Hygromycin (Roth, Karlsruhe, Deutschland; Konzentration: 20 µg/mL) und/oder Kanamycin (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande; Konzentration: 50 µg/mL) je nach transformierter Resistenzkassette zugegeben. In Abbildung 2.2 A ist beispielhaft die Selektion der erzeugten Explantate auf Selektionsmedium dargestellt. Nicht-transgene Explantate sind grau und können nicht regenerieren. Explantate, die vital und grün sind, haben vermutlich die T-DNA mit Resistenzkassette in ihr Genom integriert. Nach ca. sechs Wochen wurden die Regenerate auf frisches 601-Medium mit Antibiotika-Selektion überführt. Ein Umsetzen der Regenerate erfolgte alle 4–6 Wochen. Sobald sich aus den Regenerationsbüscheln kleine Pflanzentriebe ausbildeten, konnten molekulargenetische Analysen durchgeführt werden. Dazu wurde der entstehende Seitentrieb abgetrennt (Abbildung 2.2 B; Schnittstelle ist als schwarzer Strich gekennzeichnet) und in zwei Abschnitte geteilt. Von dem unteren Anteil des abgetrennten Seitentriebes wurde ein Teil für die Isolation genomischer DNA verwendet, während der obere Teil zur Vermehrung eingesetzt wurde. Infolgedessen konnte für die CRISPR/Cas9 modifizierte Regenerate garantiert werden, dass die Modifikation dem vermehrten Sprossteil entspricht.

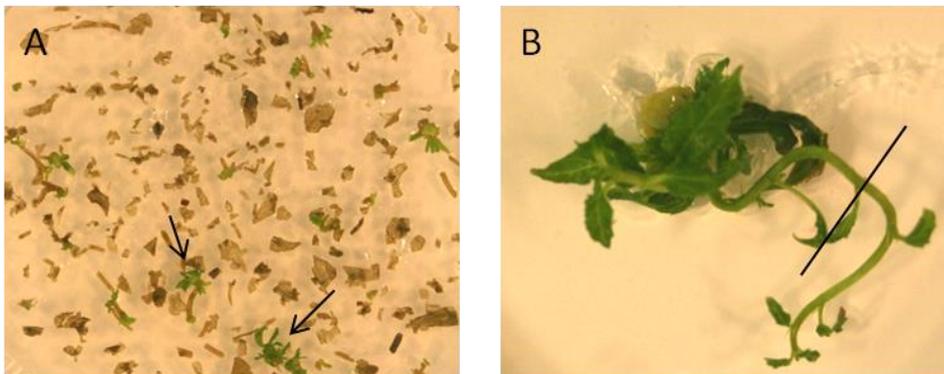


Abbildung 2.2: Selektion transgener Explantate auf Regenerationsmedium

Nach der Agrobakterien-vermittelten Transformation wurden die Explantate auf Regenerationsmedium mit Selektionsdruck ausplattiert. A: Transgene Explantate sind vital, grün und regenerieren (schwarzer Pfeil) B: Regenerationsbüschel, von dem ein Seitentrieb für molekularbiologische Analysen und zur Vermehrung verwendet werden kann (schwarze Markierung).

2.8 Isolation von Nukleinsäuren

Zur genetischen Analyse der durch CRISPR/Cas9 modifizierte Pappelregenerate und den nicht-transgenen Kontroll-Klonen wurde Desoxyribonukleinsäure (DNS, engl. DNA) und Ribonukleinsäure (RNA) isoliert. Für die verschiedenen Fragestellungen dienten unterschiedliche Gewebe als Extraktionsgrundlage. Die angewandten Nukleinsäure-

Isolationsmethoden werden im Folgenden beschrieben. RNA wurde augenblicklich bei -70 °C gelagert, während DNA zunächst für weitere Analysen bei -20 °C aufbewahrt und für langfristige Lagerung ebenfalls bei -70 °C gehalten wurde.

2.8.1 DNA-Isolation aus Blattgewebe von Pappelklonen

Die Isolation von genomischer DNA aus Pappel erfolgte in Anlehnung an Dumolin *et al.* (1995). Das Probenmaterial wurde in ein 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der Aufschluss des Materials erfolgte in der Schwingmühle MM300 (Retsch® GmbH, Haan, Deutschland) mit 21 Impulsen pro Sekunde für 2 min durch die im Eppendorf-Reaktionsgefäß enthaltenen Stahlkugeln (Ø 5 mm Retsch® GmbH, Haan, Deutschland). Währenddessen wurde der Extraktionspuffer auf 55 °C vorgewärmt und mit 1 M DTT versetzt. Dem Probenmaterial wurde 1 mL des Extraktionspuffers hinzugefügt, kräftig gemischt und für 60 min bei 55 °C inkubiert. Nach der Zentrifugation in der Heraeus Fresco 21 Centrifuge (Thermo Scientific, Waltham, USA) für 5 min bei 16.200 x g wurde der Überstand abgenommen und in ein neues 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dem Überstand wurde 1 Volumen Chloroform zugegeben, 50-malig invertiert und erneut für 20 min bei 16.200 x g zentrifugiert. Die entstandene obere Phase wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit einem halben Volumen eiskaltem 70 % Isopropanol versetzt. Die Durchmischung erfolgte durch 50-maliges Invertieren. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei -20 °C wurde für 10 min bei 16.200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und dem Pellet 1 mL eiskalter 70 % Ethanol hinzugegeben. Das Pellet wurde mit dem Ethanol vermischt und im Anschluss 10 min bei 16.200 x g zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurde das Pellet für 20–30 min kopfüber unter der Sterilwerkbank getrocknet. Je nach weiterer Verwendung wurde das Pellet in 20–100 µL Elutionspuffer durch eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C gelöst. Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA erfolgte am Spektrophotometer (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) oder am NanoDrop One^C (Thermo Scientific, Waltham, USA).

ATMAB-Extraktionspuffer	
20 g	ATMAB
10 g	PVP
0,5 M	EDTA pH 8.0
1 M	Tris-HCl pH 8.0
5 M	NaCl
ad. 1 L	ddH ₂ O

Elutionspuffer	
TE	pH 8.0
10 µg	RNase/mL TE

2.8.2 DNA-Isolation aus mykorrhizierten Pappelwurzeln

Zur Analyse der mit mykorrhizierenden Pilzen assoziierten Pappelwurzeln aus der Erdkultur, wurde DNA aus den Wurzeln und Pilzen isoliert. Ein Teil des Wurzelsystems wurde vom Wurzelballen entfernt, in Leitungswasser von Erde befreit und binokularisch untersucht. Die Wurzeln, die nach binokularischer Analyse vermutlich mit mykorrhizierenden Pilzen assoziiert waren (Abbildung 2.3), wurden vereinzelt, von überschüssigem Wasser befreit, in ein 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und augenblicklich in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Homogenisierung des Materials erfolgte durch die in dem 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß enthaltenen zwei großen Stahlkugeln (\varnothing 5 mm Retsch® GmbH, Haan, Deutschland), unter Verwendung des Bead Ruptors Elite OMNI International (BioLabProducts, Bebensee, Deutschland) bei 2,1 m/s für 30 s. Die Proben wurden mit je 900 μ L BoMAB-Extraktionspuffer, 45 μ L DTT und 18 μ L Proteinase K versetzt, 5 s kräftig durchmischt und für 17 h bei 55 °C und 300 rpm im Thermo-Heiz-Mixer HLC (HLC BioTech, Bovenden, Deutschland) inkubiert. Nach Zugabe von 600 μ L Chloroform und anschließendem Durchmischen wurden die Proben 10 min bei Raumtemperatur und 300 rpm geschüttelt. Die Wurzelproben wurden 15 min bei 6 °C und 16.200 x g in der Heraeus Fresco 21 Centrifuge (Thermo Scientific, Waltham, USA) zentrifugiert. Ein Volumen von 600 μ L Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in 225 μ L vorgelegtem Natriumacetat (3 M, pH 5.2) überführt. Nach Zugabe von 600 μ L Isopropanol und 5 μ L Glykogen wurden die Proben für 30 min bei -20 °C inkubiert. Der Überstand wurde nach einer Zentrifugation für 15 min bei 6 °C und 16.200 x g verworfen und das entstandene Pellet in 600 μ L 70 % Ethanol gelöst. Nach einer Zentrifugation für 15 min bei 6 °C und bei 16.200 x g wurde der Überstand erneut verworfen und dem Pellet 300 μ L HPLC-H₂O zugegeben. Es folgte eine Aufreinigung der Proben mittels des innuPREP Plant DNA-Kit (Analytic Jena, Jena, Deutschland). Das gelöste Pellet wurde mit 200 μ L der im Kit enthaltenen *Silica Binding Solution* vermischt und auf die Filtersäule gegeben. Die Filtersäule wurde nach einer Zentrifugation für 2 min bei 10.000 x g in ein neues Auffanggefäß überführt und 650 μ L der *Washing Solution MS* auf die Membran pipettiert. Nach einer Zentrifugation bei 10.000 x g für 1 min wurden 650 μ L der *Washing Solution MS* auf die Membran gegeben und erneut für 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Um den restlichen in der *Washing Solution MS* enthaltenen Ethanol aus dem Filter zu entfernen, wurde für 2 min bei 17.500 x g zentrifugiert. Zur Elution der DNA wurden 20 μ L des Elutionspuffers auf die Mitte des Filters gegeben, 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 1 min bei 6.000 x g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt und die DNA bei -20 °C gelagert.

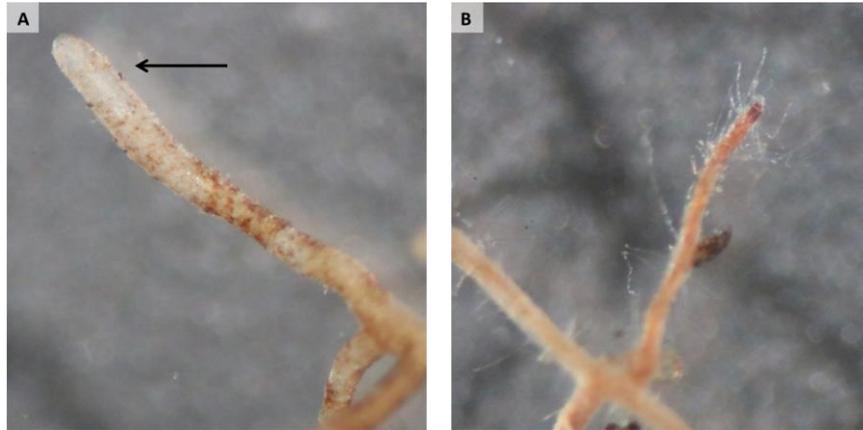


Abbildung 2.3: Mykorrhizierte und nicht-mykorrhizierte Wurzelspitze

Binokularische Aufnahme von mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Wurzelspitzen. A: Mit mykorrhizierten Pilzen assoziierte Wurzelspitze (schwarzer Pfeil) die für die DNA-Isolation eingesetzt wurde; B: Wurzelspitze ohne mykorrhizierende Pilze. Vergrößerung: 80-fach.

BoMAB-Extraktionspuffer

20,06 g	ATMAB
20 g	PVP
0,2 M	EDTA
1 M	Tris
1,4 M	NaCl
80 mM	Borsäure
ad. 1 L	ddH ₂ O

2.8.3 Isolation von genomischer DNA aus *Melampsora spec.*

Die Isolation genomischer DNA aus *Melampsora spec.* erfolgte in Anlehnung an Tian *et al.* (2004). Hierzu wurde eine Uredie mit einer sterilen Feinpinzette von der Blattunterseite entnommen und in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Uredie wurde mit einem Pistill im Eppendorf-Reaktionsgefäß gequetscht und 20 µL Extraktionspuffer hinzugegeben. Die Suspension wurde 60 min bei 37 °C und darauffolgend 10 min bei 95 °C inkubiert. Für DNA-Analysen wurden 5 µL des nicht weiter aufgereinigten Extraktes verwendet.

Extraktionspuffer

10 mM	Tris HCl pH 8.3
1,5 mM	MgCl ₂
50 mM	KCl
0,01 %	Proteinase K
0,01 %	SDS

2.8.4 Plasmid-Isolation aus Agrobakterienkulturen

Die Isolation von Plasmid-DNA erfolgte nach Knight und Monroe (http://csmbio.csm.jmu.edu/biology/courses/bio480_580/mblab/miniprep.html 26.11.2018). Eine Spatelspitze der Glycerol-Stocklösung der Agrobakterien wurde in 3 mL YEB-Medium mit den notwendigen Antibiotika überführt. Die Kultur wurde über Nacht bis zum Folgetag bei 28 °C und 200 rpm inkubiert. Zur Isolation der Plasmid-DNA wurde die Agrobakterienkultur kurz geschwenkt und 1 mL der Kultur in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 20 s bei maximaler Geschwindigkeit in der Heraeus Pico Biofuge (Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen, 100 µL des Puffers 1 hinzugegeben und kräftig gemischt. 200 µL des Puffers 2 wurden der Suspension hinzugefügt, durch invertieren gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden 150 µL eiskalten Puffers 3 zugefügt und durch Invertieren vermischt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 17.000 x g wurde der entstandene Überstand in ein neues 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 400 µL Isopropanol versetzt und kräftig gemischt. Es folgte eine weitere Inkubation für 2 min auf Eis und eine Zentrifugation für 5 min bei 17.000 x g. Der Überstand wurde entfernt und das entstandene Pellet in 200 µL absolutem Ethanol durch Schwenken gelöst. Der Überstand wurde nach einer erneuten Zentrifugation für 3 min bei 17.000 x g verworfen. Um den verbliebenen Ethanol zu entfernen, wurden die Eppendorf-Reaktionsgefäße 15–20 min geöffnet stehen gelassen und das getrocknete Pellet anschließend in 20 µL TE-Puffer gelöst. Die Konzentrationsbestimmung der isolierten Plasmid-DNA erfolgte am NanoDrop One^C (Thermo Scientific, Waltham, USA).

Puffer 1		Puffer 2		Puffer 3	
50 mM	Tris-HCl	1 %	SDS	3 M	Kaliumacetat
10 mM	EDTA	0,2 M	NaOH		pH 5.5
100 mg/mL	RNase A				
	pH 8.0				

TE-Puffer	
10 mM	Tris-HCl
1 mM	EDTA
	pH 8.0

2.8.5 RNA-Isolation aus Blatt-, Spross- und Wurzelgewebe

Die Isolation von Ribonukleinsäure erfolgte durch verschiedene Protokolle, die im Folgenden beschrieben werden.

2.8.5.1 RNA-Isolation aus Blattgewebe

Zur RNA-Isolation aus Blattmaterial von Pappellinien aus der Gewebekultur wurde das Gewebe unter sterilen Bedingungen entnommen, in ein 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Blattmaterial wurde mittels des Bead Ruptors Elite OMNI International (BioLabProducts, Bebensee, Deutschland) zerkleinert. Die Homogenisierung erfolgte durch die im Eppendorf-Reaktionsgefäß enthaltenen drei großen Keramikkugeln (Ø 2,8 mm, BioLab-Products, Bebensee, Deutschland) und 30 kleinen Keramikkugeln (Ø 1,6 mm, BioLab-Products, Bebensee, Deutschland) bei einer Geschwindigkeit von 3,55 m/s für 20 s. Die Isolation der RNA anhand des RNeasy® Plant Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) erfolgte nach Herstellerangaben bei Raumtemperatur. Alle Zentrifugationsschritte wurden in der Mikro220R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland) durchgeführt.

2.8.5.2 RNA-Isolation aus Wurzelgewebe mittels der CTAB-Methode

Die Isolation von RNA aus Wurzelgewebe erfolgte in Anlehnung an Chang *et al.* (1993). Das Wurzelmaterial wurde von Pflanzen aus der Erdkultur im Gewächshaus entnommen. Zu beachten war, dass junge, helle Wurzeln für die RNA-Isolation verwendet wurden. Mit sterilem Leitungswasser wurde das Wurzelmaterial grob von Erde befreit, in ein 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß mit drei kleinen Stahlkugeln (Ø 3 mm, Retsch® GmbH, Haan, Deutschland) überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der Aufschluss des Materials erfolgte in der Schwingmühle MM300 (Retsch® GmbH, Haan, Deutschland) mit 20 Impulsen pro Sekunde für 1 min und wurde zweimalig durchgeführt. Die Stahlkugeln wurden aus den Eppendorf-Reaktionsgefäßen entnommen und das zerkleinerte Probenmaterial erneut in flüssigen Stickstoff überführt. Der CTAB-Extraktionspuffer wurde mit 2 % β -Mecaptoethanol und 0,054 % Spermidin versetzt, durchmischt und bei 65 °C im Mixing Block MB (BIOER) vorgewärmt. 1 mL des Puffers wurde auf das zerkleinerte Material gegeben, kräftig gemischt und 10 min bei 65 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben kräftig durchmischt und 2 min bei Raumtemperatur (RT) und 16.500 x g in der Mikro220R (Hettich Zentrifugen, Lab Technology, Tuttlingen, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 1 Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) versetzt und durch Inventieren vermischt. Nach der

2 Material und Methoden

Zentrifugation für 20 min mit 16.500 x g bei RT hat sich die Probe in zwei Phasen getrennt, wobei für die weitere RNA-Isolation nur die obere Phase verwendet wurde. Die obere Phase wurde in ein neues 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 1 Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) versetzt und durch Inventieren vermischt. Nach einer erneuten Zentrifugation für 20 min bei RT und 16.500 x g, wurde die obere Phase in ein neues 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 1/3 Volumen 8 M LiCl versetzt. Nach vorsichtigem Mischen wurde die RNA über Nacht bei 4 °C gefällt.

Am Folgetag wurden die Proben für 20 min bei 18.000 x g und 4 °C zentrifugiert, der entstandene Überstand verworfen und das Pellet in 200 µL SSTE durch Inkubation für 2 min im Thermoblock gelöst. Nach Zugabe von 1 Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) wurden die Proben durch Invertieren gemischt und für 20 min bei 18.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde in ein neues auf Eis stehendes 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 2 Volumen eiskalter absoluter Ethanol hinzugegeben. Nach der Zugabe von 1 µL Glykogen (35 µg/µL) wurde die RNA über Nacht bei -20 °C gefällt.

Am Folgetag wurden die Proben für 20 min bei 18.000 x g und 4 °C zentrifugiert und der entstandene Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol versetzt und durch Invertieren gelöst. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 18.000 x g und 4 °C wurde der Überstand abgenommen. Um den restlichen Ethanol zu entfernen, wurde für 2 min zu genannten Bedingungen zentrifugiert. Unter der Sterilwerkbank wurden die Pellets für 10–20 min getrocknet, im Anschluss in 30 µL RNase-freien Wasser gelöst und auf Eis gehalten.

CTAB-Extraktionspuffer		SSTE-Puffer	
2 %	CTAB	1 M	NaCl
2 %	PVP	0,5 %	SDS
25 mM	EDTA pH 8.0	10 mM	Tris-HCl pH 8.0
100 mM	Tris-HCl pH 8.0	1 mM	EDTA
2 M	NaCl		

2.8.5.3 RNA-Isolation aus verschiedenen Pflanzengeweben

Zur Isolation von RNA aus Blatt-, Spross und Wurzelmaterial wurde das SpectrumTM Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) verwendet. Das Pflanzenmaterial für die Isolation aus Blatt- und Sprossgewebe wurde unter sterilen Bedingungen aus der Gewebekultur, das Wurzelgewebe aus der Erdkultur im Gewächshaus entnommen. Die verschiedenen Gewebe wurden in ein 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 3 großen Stahlkugeln (Ø 5 mm Retsch® GmbH, Haan, Deutschland) überführt und in flüssigem

2 Material und Methoden

Stickstoff schockgefroren. Die Homogenisierung des Materials erfolgte in der Schwingmühle MM300 (Retsch® GmbH, Haan, Deutschland) mit 20 Impulsen pro Sekunde. Blatt- und Sprossmaterial wurde jeweils zweimalig und Wurzelmaterial dreimalig für 40 s zerkleinert. Die RNA-Isolation wurde bei Raumtemperatur (RT) und nach Herstellerangaben durchgeführt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten in der Mikro220R (Hettich Zentrifugen, Lab Technology, Tuttlingen, Deutschland) bei RT und 16.000 x g.

Das homogenisierte Material wurde mit 500 µL *Lysis-Solution*, der zuvor β-Mecaptoethanol hinzugegeben wurde, versetzt und kräftig gemischt. Nach einer Inkubation von 5 min bei 65 °C wurde für 3 min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde auf eine Filter-Säule gegeben und für 3 min zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Durchfluss mit 250 µL *Binding-Solution* für Blatt- und Sprossgewebe und 500 µL *Binding-Solution* für Wurzelgewebe versetzt und durch Pipettieren vermischt. Die Lösung wurde auf die Binde-Säule gegeben, 1 min mit geschlossenem Deckel zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Es wurden 300 µL Waschlösung auf die Binde-Säule gegeben, erneut für 1 min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.

Die DNase-Behandlung erfolgte im nächsten Schritt auf der Binde-Säule. Hierzu wurde das On-column DNase Digestion Set (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) verwendet. Pro Probe wurden 10 µL *DNaseI* mit 70 µL *DNase Digestion Buffer* versetzt, durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischt, auf die Binde-Säule gegeben und für 15 min inkubiert. Im Anschluss wurden 500 µL Waschlösung 1 auf die Binde-Säule gegeben, 1 min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Eine zweite Waschung erfolgte mit 500 µL Waschlösung 2 und eine Zentrifugation für 30 s. Der Durchfluss wurde verworfen und die Binde-Säule durch Zentrifugation von 1 min getrocknet. Zur Elution der RNA wurde die Binde-Säule in ein neues 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 50 µL der *Elutions-Solution* auf die Mitte der Membran gegeben. Nach einer Inkubation von 2 min wurde für 1 min zentrifugiert und die RNA von der Membran gelöst.

2.8.5.4 DNase-Behandlung nach RNA-Isolation

Nach der Isolation der RNA mittels des RNeasy® Plant Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) und der CTAB-Methode musste eine DNase-Behandlung erfolgen, um mögliche Rückstände genomischer DNA zu beseitigen. Wurde die RNA-Isolation mittels des Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) durchgeführt, war eine DNase-Behandlung nicht nötig, da diese bereits auf der Säule erfolgte. Die DNase-Behandlung wurde anhand des Turbo-DNA-free™ Kits (Thermo Fischer Scientific/ Ambion, Waltham, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden bis zu 10 µg RNA

eingesetzt und die DNase-Behandlung standardmäßig wie angegeben im 25 µL Ansatz durchgeführt:

Ansatz der DNase-Behandlung (25 µL)	
10 g	RNA
5,5 µL	TURBO DNase Buffer (10x)
1 µL	TURBO DNase (2 Units/µL)
ad. 25 µL	ddH ₂ O RNase-frei

Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde nochmals 1 µL DNase hinzugegeben und erneut für 30 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 10 µL des *DNase Inactivation Reagents* der Probe zugesetzt und 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Währenddessen wurde die Probe mehrmals durch Schnippen vermischt. Nach einer Zentrifugation für 90 s bei 10.000 x g und RT wurde der Überstand abgenommen, in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und sofort auf Eis gehalten.

2.8.5.6 Reinigung der RNA

Um mögliche Rückstände der DNase zu entfernen und eine höhere RNA-Konzentration zu erzielen, wurde das RNeasy Mini Elute Cleanup Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Die Reinigung der RNA erfolgte bei Raumtemperatur und alle erforderlichen Zentrifugationsschritte wurden in der Mikro220R (Hettich Zentrifugen, Lab Technology, Tuttlingen, Deutschland) durchgeführt.

2.8.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit der isolierten Nukleinsäuren wurde am Spektrophotometer (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) oder am NanoDrop One^C (Thermo Scientific, Waltham, USA) bestimmt. Hierzu wurden 2 µL der RNA oder DNA für die Messungen eingesetzt. Die Messwerte 260/280 geben die Reinheit der DNA/RNA an. Ein Wert von 1,8 für das Verhältnis 260/280 wird als reine DNA angesehen, bei RNA liegt dieser bei 2,0. Das Verhältnis 260/230 gibt einen Eindruck über mögliche Verunreinigungen, für reine Nukleinsäuren liegt dieser Wert idealer Weise bei 2,0 bis 2,2 ([https://biosci-batzerlab.biology.lsu.edu/Genomics/documentation/3130_NanoDrop_tips .pdf](https://biosci-batzerlab.biology.lsu.edu/Genomics/documentation/3130_NanoDrop_tips.pdf), 02.11.2018).

2.9 Analyse von Nukleinsäuren

2.9.1 Oligonukleotide

Die zur molekulargenetischen Analyse von Nukleinsäuren verwendeten und erzeugten Oligonukleotide zur Amplifikation von DNA- und cDNA-Fragmenten sind in Tabelle 6.2 im Anhang gelistet.

2.9.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. *Polymerase chain reaction*; PCR) dient der Vervielfältigung von spezifischen Nukleinsäurefragmenten. Für die Amplifikation spezifischer Fragmente werden synthetische Oligonukleotide verwendet. Abhängig von dem CG-Gehalt zum AT-Gehalt der Oligonukleotide wird die Annealing-Temperatur für die einzelne Reaktion bestimmt. Die Amplifikation von Fragmenten zur Analyse der Modifikation durch CRISPR/Cas9 erfolgte standardmäßig im 25 μL oder 15 μL Ansatz. In beiden Ansätzen wurden identische Konzentrationen der Reagenzien verwendet, lediglich die Menge an DNA-Template betrug in beiden Ansätzen 100 ng/ μL .

PCR-Ansatz (25 μL)	
7,5 μL	10x BD-Buffer (DCS)
1,8 μL	MgCl ₂ (25 mM)
0,5 μL	dNTP Mix (10 mM)
1 μL	5' Oligonukleotid (10 μM)
1 μL	3' Oligonukleotid (10 μM)
0,2 μL	Taq-Polymerase (5 U/ μL)
1 μL	DNA-Template (100 ng/ μL)
ad. 25 μL	ddH ₂ O

Die PCR erfolgte im Thermocycler SensoQuest (biolab products, Göttingen, Deutschland) nach folgendem Grundprogramm. In Abhängigkeit der verwendeten synthetischen Oligonukleotide und der zu synthetisierenden Fragmentgröße wurden Annealing-Temperatur und Elongationszeit angepasst. DNA-Amplikons wurden standardmäßig in 35 Zyklen und cDNA-Amplikons in 40 Zyklen synthetisiert.

PCR-Programm		
Denaturierung	3 min	95 °C
Denaturierung	30 s	95 °C
Annealing	1 min	48 °C–58 °C
Elongation	1–2 min	72 °C
Elongation	10 min	72 °C
Pause		4 °C

← 35–40x

2 Material und Methoden

Unter Verwendung der PCR wurde die erfolgreiche Transformation der erzeugten transgenen Linien überprüft. Zum Nachweis einer erfolgreichen Integration der gesamten T-DNA in das Pappelgenom wurde das an der linken Randseite (*left border*) befindliche *hph*-Gen bzw. das *nptII*-Gen amplifiziert und zum Nachweis des rechten Randbereiches (*right border*) ein Teil der gRNA amplifiziert (Abbildung 2.4).

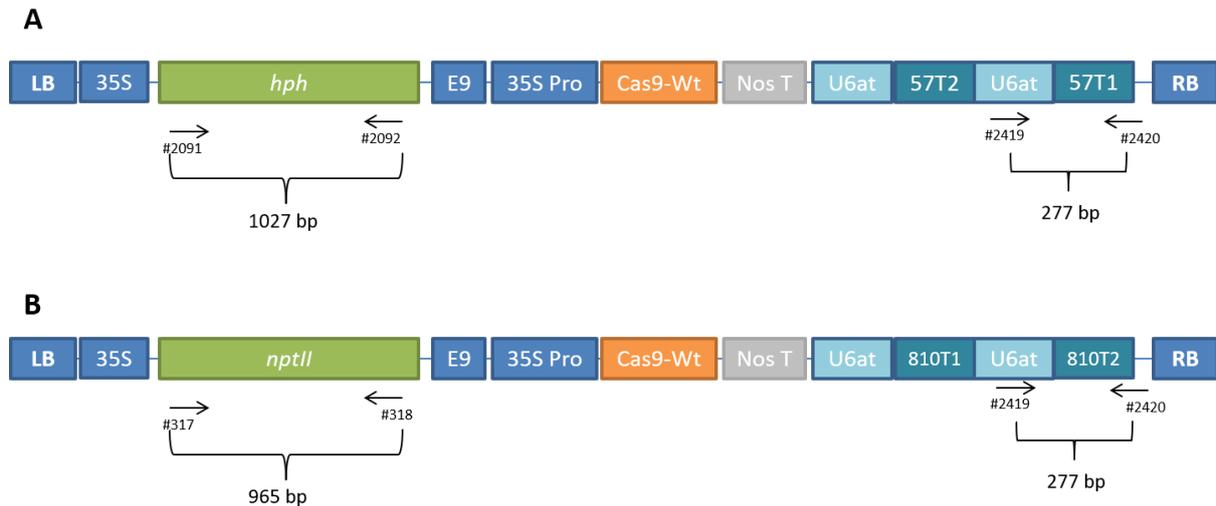


Abbildung 2.4: Darstellung der über Agrobakterien-Transformation eingebrachten T-DNAs

A: T-DNA aus A259 mit den gRNAs zur Veränderung des *NFP-like1* B: T-DNA aus A260 mit den gRNAs zur Veränderung des *NFP-like3* und *NFP-like4*. LB: *left border* der T-DNA; 35S: 35S-Promotor; *nptII*: kodierende Sequenz zur Kanamycin-vermittelnden Resistenz; *hph*: kodierende Sequenz zur Hygromycin-vermittelnden Resistenz; E9: Terminator Rbcs-E9; Cas9-Wt: kodierende Sequenz des Cas9-Wildtyp Gens (*Streptococcus pyogenes*); Nos T: Nopalinsynthese Terminator; U6at: U6-Promotor aus *Arabidopsis thaliana*; 57T2: gRNA2 *NFP-like1* Target 2; 57T1: gRNA1 *NFP-like1* Target 1; 810T1: gRNA3 *NFP-like3* und *NFP-like4* Target 1; 810T2: gRNA4 *NFP-like3* und *NFP-like4* Target 2; RB: *right border*; Nachweis Hygromycin (*hph*) mit den Oligonukleotiden #2091 und #2092, resultierendes Fragment 1027 bp; Nachweis gRNA-Fragment mit den Oligonukleotiden #2419 und #2420, resultierendes Fragment 277 bp; Nachweis Kanamycin (*nptII*) mit den Oligonukleotiden #317 und #318, resultierendes Fragment 965 bp.

2.9.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Größenauftrennung von Nukleinsäurefragmenten erfolgte durch Gelelektrophorese. Hierzu wurden in Abhängigkeit der Fragmentgröße 1,3–2 % Agarose in 0,5x TBE-Puffer aufgekocht und dem flüssigen Agarosegel ROTI®-GELSTAIN ready to use (Roth, Karlsruhe, Deutschland) nach Herstellerangaben zugefügt. Die Auftrennung der Nukleinsäurefragmente im ausgehärteten Agarosegel erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 100–120 V für ca. 60 min unter Verwendung des PHERO-Stab 500 (BioTec-Fischer, Reiskirchen, Deutschland). Die optische Auswertung wurde unter Verwendung von UV-Strahlung am Intas (Intas Science Imaging, Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

TBE-Puffer 10x Stammlösung

108 g	Tris ultrapure
55 g	Borsäure
40 mL	EDTA (0,5M)
	pH 8,3
ad. 1 L	ddH ₂ O

2.9.4 Aufreinigung von PCR-Fragmenten

Die Aufreinigung von PCR-Fragmenten erfolgte direkt nach der Amplifikation über Elution aus dem Agarosegel anhand des PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) oder des innuPREP DOUBLEpure Kit (Analytik Jena, Jena, Deutschland) nach Herstellerangaben. Um eine Kontamination mit Salzen für nachfolgende Sequenzierungen zu verringern, wurden die aufgereinigten Fragmente mit sterilem ddH₂O pH 8,5 eluiert.

2.9.5 Herstellung von Digoxigenin-markierten Sonden

Zur Detektion von T-DNA-Integrationen in das Pappelgenom unter Verwendung des Southern-Blots wurden Sonden benötigt, die komplementär zu einem Teilbereich der T-DNA sind. Die Sonden werden im Southern-Blot an die einzelsträngige DNA hybridisiert. Die Detektion der Sonden wird über ein mit Digoxigenin (DIG) markiertes Uracil-Nukleotid (DIG-UTP) gewährleistet, dass über mit einer Anti-DIG-Alkalinen Phosphatase und der Zugabe von CSPD eine chemische Reaktion erzeugt, bei der Licht emittiert wird. Die Sonden wurden mit Hilfe des PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) erzeugt. Durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde in das Fragment, das als Sonde verwendet werden sollte, Digoxigenin-markierte Uracil-Basen integriert. Durch die Digoxigeninmarkierten Basen sind die Fragmente schwerer als ein Fragment ohne Digoxigenin, sodass die erfolgreiche Synthese über Gelelektrophorese nachgewiesen werden kann. Das mit DIG versetzte DNA-Fragment läuft langsamer als die nicht-markierte Kontrolle. Für die Kontroll-PCR wurden die nicht-markierten dNTPs des PCR DIG Probe Synthesis Kit verwendet. Die Erzeugung der DIG-markierten Sonden erfolgte im 50 µL Ansatz.

Ansatz zur Erzeugung DIG-markierter Sonden (50 µL)

5 µL	PCR-Buffer with MgCl ₂ (10x)
5 µL	PCR DIG Probe Synthesis Mix (DIG-UTP)
2 µL	5' Oligonukleotid (10 µM)
2 µL	3' Oligonukleotid (10 µM)
0,5 µL	Enzym Mix Taq-Polymerase (5 U/µL)
2 µL	DNA (10 ng/µL)
ad. 50 µL	ddH ₂ O

2 Material und Methoden

Die Amplifikation der PCR-Fragmente erfolgte im Thermocycler SensoQuest (biolab products, Göttingen, Deutschland) nach folgendem Protokoll. Variiert wurde lediglich die Annealing-Temperatur in Abhängigkeit der verwendeten Oligonukleotide.

PCR-Programm

Denaturierung	2 min	95 °C	
Denaturierung	30 s	95 °C	
Annealing	30 s	48 °C–58 °C	
Elongation	40 s	72 °C	
Elongation	7 min	72 °C	
Pause		4 °C	

Bei der Herstellung der Sonden konnten längere Fragmente ab ca. 900 bp, im Gegensatz zu kürzeren Fragmenten mit ca. 700 bp, zu den gewählten Bedingungen nicht amplifiziert werden. Das Amplikon der Hygromycin-Sonde, die den Sequenzbereich eines Introns umfasste, konnte ebenfalls nicht erzeugt werden. Für die Herstellung der *UBIQUITIN*-Sonde wurde, abweichend vom oben angegebenen Ansatz, die Konzentration der DIG-UTPs um die Hälfte reduziert und durch nicht-markierte dNTPs ersetzt.

Nach der erfolgreichen Herstellung der mit DIG markierten Sonden, wurden diese aus dem Agarosegel ausgestanzt und mittels des innuPREP DOUBLEpure Kit (Analytik Jena, Jena, Deutschland) aufgereinigt. Die Konzentration der Sonde wurde über die Intensität des elektrophoretisch aufgetrennten Amplikons im Vergleich zur verwendeten SmartLadder (Eurogentec, Belgien) bestimmt. Hierzu wurden 5 µL der aufgereinigten Sonde mit 5 µL ddH₂O und 1 µL Orange G (30 % Saccharose, 1 % Orange G) versetzt und für die Elektrophorese aufgetragen.

2.9.6 Southern-Blot

Der Nachweis zur Integrationshäufigkeit der über Agrobakterium transformierten T-DNA in das Pappelgenom, erfolgte durch Southern-Blot und anschließendem Nachweis der T-DNA über eine DIG-markierte Sonde. Beim Southern-Blot wird fragmentierte DNA von einem Agarosegel über Kapillarkraft auf eine Membran übertragen (Southern, 1975). Mit Hilfe von markierten Sonden, die sich komplementär an spezifische Sequenzen der transformierten T-DNA anlagern, kann über eine Chemilumineszenz-Reaktion die Häufigkeit der Integrationsereignisse bestimmt werden.

2.9.6.1 Restriktionsverdau

Die gesamt DNA, der zu untersuchenden transgenen und nicht-transgenen Linien wurde mit einem Restriktionsenzym fragmentiert. Um möglichst kleine DNA-Fragmente zu erzeugen, wurde ein Restriktionsenzym verwendet, das möglichst häufig im Pappelgenom schneidet. Dabei war sicherzustellen, dass das Restriktionsenzym nur einmalig in der T-DNA und nicht in einem Sequenzbereich, der als Sonde verwendet wird, restringiert. Zur Analyse der T-DNA-Integrationen in den mit den Agrobakterienklonen A259 und A260 transformierten Linien, wurde das Restriktionsenzym *BclI* (Thermo Scientific, Waltham, USA) zur Fragmentierung der DNA verwendet. *BclI* schneidet mehrfach in den T-DNA Regionen von A259 und A260 (Anhang Abbildung 6.1 und 6.2), jedoch nicht im Randbereich der T-DNA, in der die Sonde integriert ist. *BclI* weist im Pappelreferenzgenom *P. trichocarpa* 161.831 Restriktionsschnittstellen auf (Dr. Birgit Kersten Thünen Institut für Forstgenetik, Großhansdorf, Deutschland). Der Restriktionsverdau wurde für 4 h bei 55 °C durchgeführt und erfolgte standardmäßig im 20 µL Ansatz. Für die Elektrophorese wurde der Restriktionsansatz kurz zentrifugiert und mit 2 µL Ladepuffer versetzt. Als Größenstandard diente der DNA Molecular Weight Marker II (Roche, Schweiz). Die elektrophoretische Auftrennung der fragmentierten Pappel-DNA erfolgte im 1,3 % Agarose-TBE-Gel über Nacht bei einer Spannung von 50 Volt.

Restriktionsansatz (20 µL)		Ladepuffer	
X µL	20 ng Plasmid-DNA, 20 µg Pappel-DNA	2,5 mL	Glycerin (100 %)
2 µL	Puffer	20 µL	EDTA
2 µL	Restriktionsenzym	40 mg	Xylencyanol
ad. 20 µL	ddH ₂ O	40 mg	Bromphenolblau
		ad. 10 mL	ddH ₂ O

2.9.6.2 Denaturierung und Neutralisierung des Agarosegels

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der fragmentierten DNA wurde der Gellauf dokumentiert. Alle Schritte zur Behandlung des Gels oder der Membran in den folgenden Abschnitten, erfolgten unter leichtem Schwenken in einer Plastikschaale auf dem Taumelschüttler Biometra WT12 (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland). Sofern nicht anders vermerkt, wurden die in den folgenden Abschnitten verwendeten Puffer und Lösungen durch Autoklavieren sterilisiert.

Das Gel wurde für 10 min in 0,25 M HCl inkubiert. Es folgte eine zweimalige Inkubation für 30 min im Denaturierungspuffer und eine zweimalige Inkubation für 30 min im Neutralisierungspuffer. Anschließend wurde das Agarosegel 5 min in 10x SSC äquilibriert.

2 Material und Methoden

Denaturierungspuffer		Neutralisierungspuffer		20x SSC	
20 g	NaOH Pellets	121,14 g	Tris ultrapure	175,3 g	NaCl
87,6 g	NaCl	87,6 g	NaCl	88,2 g	Na-Citrat
ad. 1 L	ddH ₂ O		pH 7,4		pH 7
	pH 13	ad. 1 L	ddH ₂ O	ad. 1 L	ddH ₂ O

2.9.6.3 Southern-Blot Aufbau

Die Übertragung der Nukleinsäurefragmente aus dem Agarosegel auf eine Membran erfolgte durch einen Kapillarblot in einer Agarosegelkammer (Abbildung 2.5). Das Whatman™-Papier (GE Healthcare, Chicago, USA) wurde zugeschnitten, sodass die Enden in beide Kammern der Agarosegelkammer ragten. Die Kammern wurden mit 10x SSC befüllt, sodass das Whatman™-Papier durchgehend feucht war. Auf die saugfähige, feuchte Unterlage wurden vier auf Größe des Agarosegels zugeschnittene und in 10x SSC getränkte Whatman™-Papiere positioniert und das Agarosegel mit der Oberseite nach unten aufgelegt. Die auf die Größe des Agarosegels zugeschnittene Nylon-Membran (*positively charged*, Roche, Mannheim, Deutschland) wurde blasenfrei auf dem Agarosegel positioniert. Weitere vier in 2x SSC getränkte Whatman™-Papiere wurden auf die Nylon-Membran aufgelegt. Abschließend wurde ein Paket Handtuchpapier auf die Whatman™-Papiere platziert und der Aufbau mit einer Glasplatte und einem Gewicht fixiert. Durch die trockenen Handtuchpapiere wird ein Sog erzeugt, sodass die DNA mit dem SSC auf die Nylon Membran übertragen wird. Der Blot kann für 12–24 h durchgeführt werden. Durch einen Austausch der feuchten Handtuchpapiere gegen trockene Handtuchpapiere, wird der Sog erneut verstärkt.

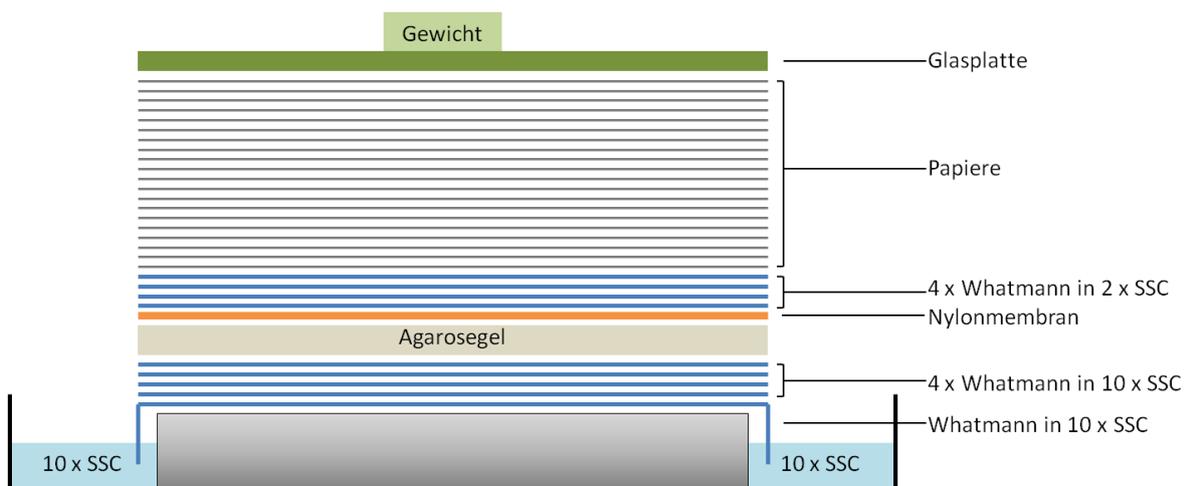


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des Southern-Blot Aufbaus

Dargestellt ist schematisch der Blot Aufbau zur Übertragung der Nukleinsäurefragmente auf eine Nylonmembran.

Am Folgetag wurde über eine Dokumentation des Agarosegels nachgewiesen, ob die DNA-Fragmente erfolgreich auf die Membran übertragen wurden. Durch beidseitiges UV-Crosslinken der Membran für 45 s bei 120 mJ im UV-Stratalinker (Stratagene, San Diego, USA) wurde die DNA fixiert.

2.9.6.4 Prähybridisierung und Hybridisierung

Vor der Hybridisierung der DNA mit der spezifischen DIG-markierten Sonde wurde die Membran für ca. 4 h in der Prähybridisierungslösung im Hybridisierungskubator GFL 3032 (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland) unter leichtem Schütteln bei 42 °C inkubiert. Die Prähybridisierungslösung wurde nicht autoklaviert und bei -20 °C gelagert.

Prähybridisierungslösung		
25 mL	20x SSC	(Unterunterabschnitt 2.9.6.2)
20 mL	10 % <i>Blocking Solution</i>	(Unterunterabschnitt 2.9.6.5)
50 mL	Formamid	
1 mL	10 % Lauroylsarkosin	
1 mL	0,5 % Hefe RNA	
2 mL	10 % SDS	
ad. 100 mL	ddH ₂ O	

Nach der Prähybridisierung wurde die verwendete Lösung von der Membran entfernt und die Hybridisierungslösung hergestellt, indem der Prähybridisierungslösung die spezifische DIG-markierte Sonde zugegeben wurde (50 ng/mL Prähybridisierungslösung). Die Sonde in der Hybridisierungslösung wurde durch 5-minütiges Erhitzen auf 95 °C denaturiert, sodass sie sich an die komplementären Sequenzen der fragmentierten DNA auf der Membran anlagern kann. Nach einer 1-minütigen Kühlung auf Eis, wurde die Hybridisierungslösung auf der Membran verteilt. Die Inkubation der Membran über Nacht bei 42 °C erfolgte anhand der „Sandwich“-Methode nach Fladung *et al.* (1995). Die Membran wird bei dieser Methode mit der Hybridisierungslösung in eine offene Plastikfolie gelegt, die zwischen zwei Glasplatten eingefasst ist und im Anschluss mit zwei Klammern und *Spacern* fest verschlossen wird (Abbildung 2.6).

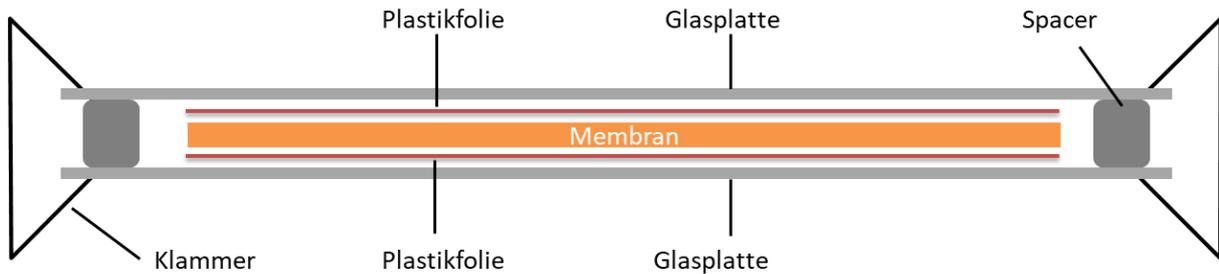


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der „Sandwich“-Methode (Fladung *et al.*, 1995)

Dargestellt ist schematisch das Sandwich, in dem die Membran mit der Hybridisierungslösung über Nacht inkubiert wird. Hierzu wird die Membran in eine Plastikfolie gegeben, die nach drei Seiten hin geöffnet ist. Die Membran in der Plastikfolie wird im Anschluss zwischen zwei Glasplatten eingefasst, die in einer definierten Breite durch zwei *Spacer* getrennt sind. Um das „Sandwich“ zu fixieren, werden die Glasplatten mit Klammern auf den *Spacern* zusammengedrückt

2.9.6.5 Waschung und Chemilumineszenz Reaktion

Am Folgetag wurde die Membran zweimalig für 10 min in 2x SSC; 0,1 % SDS gewaschen. Daraufhin wurde die Membran in 0,5x SSC; 0,1 % SDS für 10 min bei 65 °C im Schüttelwasserbad GFL 1083 (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland) und nachfolgend für 15 min in 0,1x SSC; 0,1 % SDS ebenfalls bei 65 °C geschwenkt.

Alle folgenden Behandlungen der Membran wurden bei Raumtemperatur und unter leichtem Schwenken in einer Plastikschaale auf dem Taumelschüttler Biometra WT12 (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Die Membran wurde für 5 min in 1x Maleinsäurepuffer und anschließend 45 min in *Blocking*-Puffer inkubiert. Für die Chemilumineszenz-Reaktion wurde frischem *Blocking*-Puffer Anti-Digoxigenin-AB FAB-fragments (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) in einer 1:10.000 Verdünnung zugegeben, für 5 min unter Rühren vermischt und die Membran anschließend für 30 min in dieser Lösung geschwenkt. Die Membran wurde dreimalig für 15 min in DIG-Waschpuffer gewaschen und 5 min in *Detection*-Puffer äquilibriert. Zur Detektion, der mit Anti-DIG gebundenen Sonde wurde 1 mL des *Detection*-Puffers mit 20 µL CSPD (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) versetzt. Die *Detection*-Puffer CSPD-Lösung wurde auf der Membran verteilt, die Membran eingeschweißt und für 90 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Das CSPD wird von der an dem Anti-DIG gekoppelten Phosphatase dephosphoryliert und emittiert Licht. Das emittierte Licht wurde vom ChemStudio PLUS (Analytik Jena, Jena, Deutschland) detektiert. Die Auswertung des emittierten Lichts erfolgte unter Verwendung der VisionWorks® Software. Die Anzahl der detektierten Fragmente geben Aufschluss über die T-DNA-Integrationszahl in das Pappelgenom.

2 Material und Methoden

4x Maleinsäurepuffer	
46,6 g	Maleinsäure
35,08 g	NaCl
30 g	NaOH
ad. 1 L	ddH ₂ O
	pH 7.5

Detection-Puffer	
50 mL	1 M Tris (pH 9,5)-
10 mL	5 M NaCl
25 mL	1 M MgCl ₂
ad. 500 mL	ddH ₂ O

10 % Blocking Solution	
10 g	Blocking Reagent
ad. 1 L	1x Maleinsäurepuffer (erwärmt)

Blocking-Puffer	
40 mL	Blocking Solution (10 %)
ad 400 mL	1x Maleinsäurepuffer

DIG-Waschpuffer	
997 mL	1x Maleinsäurepuffer
3 mL	Tween20

War eine Detektion mittels des ChemStudio PLUS nicht möglich, wurde die Membran erneut für 5 min in *Detection*-Puffer äquilibriert, mit der im *Detection*-Puffer enthaltenen CSPD-Lösung versetzt, auf der Membran verteilt und die Membran eingeschweißt. Nach einer Inkubation von 90 min bei 37 °C im Dunkeln, wurden zwei Filme übereinander auf die Membran gelegt. Nach einer Inkubation von 90 min bei 37 °C wurde die Filmkassette aus dem Wise Cube Inkubator (Witeg Labortechnik GmbH, Wertheim, Deutschland) entnommen und die Filme direkt entwickelt. Die Entwicklung der Filme erfolgte für 5 min in Entwicklerlösung, 1 min in Essigsäure und letztlich für 10 min in Fixierlösung. Nachdem die Filme mit Leitungswasser gewaschen wurden, erfolgte eine Trocknung bei 60 °C im Heizschrank Heraeus Typ SUT 6200 (Heraeus, Hanau, Deutschland).

Entwicklerlösung	
1,25 L	Entwicklerkonzentrat G150 (AGFA)
6,25 L	ddH ₂ O

Fixierlösung	
1,5 L	Fixierkonzentrat G354 (AGFA)
6 L	ddH ₂ O

Essigsäure	
340 mL	100 % Eisessig
8160 mL	ddH ₂ O

2.9.6.6 „Stripping“ der Membran

Für den Nachweis eines anderen Zielfragmentes in der T-DNA konnte die gebundene Sonde von der DNA entfernt werden, sodass eine andere Sonde an die offenen Bindungsstellen neu hybridisiert werden konnte. Hierfür wurde die Membran für 1 min in ddH₂O gewaschen und im Anschluss zweimalig für 15 min bei 37 °C in 0,2 M NaOH; 0,1 % SDS im

Schüttelwasserbad GFL 1083 (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland) inkubiert. Ein weiterer Waschschrift erfolgte für 5 min bei Raumtemperatur in 2x SSC. Die Membran wurde daraufhin entweder in 2x SSC gelegt, eingeschweißt und bei -20 °C gelagert oder für eine erneute Hybridisierung zur Prähybridisierung mit anschließender Detektion verwendet.

2.9.7 Thermal Asymmetric Interlaced (TAIL)-PCR

Zum Nachweis der T-DNA-Integrationsorte in das Pappelgenom wurde die Technik der TAIL-PCR genutzt. Bei der TAIL-PCR werden ein spezifisches Oligonukleotid, das in der T-DNA bindet und ein degeneriertes Oligonukleotid, das unspezifisch im Pappelgenom binden kann, verwendet. Die TAIL-PCR wurde in drei Ansätzen, TAIL I, TAIL II und TAIL III, durchgeführt. Im ersten Ansatz wurde das spezifische Oligonukleotid in der Nähe der Randsequenz der T-DNA gesetzt, um mit dem degenerierten Oligonukleotid aus der T-DNA heraus in das Pappelgenom zu amplifizieren. Da das degenerierte Oligonukleotid an zahlreichen Positionen im Pappelgenom und in der T-DNA binden kann, werden in der ersten TAIL-PCR zahlreiche Amplikons erzeugt. Zur Amplifikation von Pappelgenom- und T-DNA-Fragmenten wurden die entstandenen und nicht weiter aufgereinigten PCR-Fragmente für die TAIL II in einer 1:50 Verdünnung eingesetzt. In der folgenden TAIL-PCR wurden das gleiche degenerierte Oligonukleotid und ein neues spezifisches Oligonukleotid verwendet, das innerhalb des zuerst amplifizierten Fragmentes lag. Mit den in der TAIL II entstandenen PCR-Fragmenten wurde die TAIL III durchgeführt, in der wiederum das degenerierte Oligonukleotid und ein neues spezifisches Oligonukleotid, das innerhalb des durch TAIL II amplifizierten Fragmentes bindet, verwendet wurde. Die durch die TAIL III entstandenen Fragmente wurden zur Sanger-Sequenzierung unter Verwendung des spezifischen Oligonukleotids eingesetzt. Die TAIL-PCR erfolgte standardmäßig im 25 µL Ansatz.

TAIL-PCR Ansatz (25 µL)

7,5 µL	10x BD-Buffer (DCS)
1,8 µL	MgCl ₂ (2 mM)
0,5 µL	dNTP Mix (10 mM)
1 µL	5' Oligonukleotid (10 µM) 64-fach degeneriert
1 µL	3' Oligonukleotid (10 µM) spezifisches Oligonukleotid
0,2 µL	Taq-Polymerase (5 U/µL)
1 µL	DNA-Template (100 ng/µL)
ad. 25 µL	ddH ₂ O

2 Material und Methoden

Die TAIL-PCRs erfolgten im Thermocycler SensoQuest (biolab products (Göttingen, Deutschland) nach folgenden Programmen. Die Annealing-Temperaturen wurden auf das jeweilige spezifische Oligonukleotid angepasst und zur Verdeutlichung zweifach unterstrichen. Das resultierende PCR-Produkt wurde 1:50 verdünnt und als Matrize für die jeweils folgende TAIL-Reaktion eingesetzt.

PCR-Programm TAIL I:

Denaturierung	1 min	93 °C		
Denaturierung	1 min	95 °C		
Denaturierung	30 s	94 °C	←	5x
Annealing	1 min	<u>53 °C</u>		
Elongation	2,5 min	72 °C		
Denaturierung	30 s	94 °C		
Annealing	3 min	25 °C		
Elongation	2,5 min	72 °C (Rampe auf 72 °C)		
Denaturierung	10 s	94 °C	←	15x
Annealing	1 min	<u>53 °C</u>		
Elongation	2,5 min	72 °C		
Denaturierung	10 s	94 °C		
Annealing	1 min	<u>53 °C</u>		
Elongation	2,5 min	72 °C		
Denaturierung	10 s	94 °C		
Annealing	1 min	44 °C		
Elongation	2,5 min	72 °C		
Elongation	5 min	72 °C		
Pause		4 °C		

PCR-Programm TAIL II:

Denaturierung	10 s	94 °C	←	12x
Annealing	1 min	<u>53 °C</u>		
Elongation	2,5 min	72 °C		
Denaturierung	10 s	94 °C		
Annealing	1 min	<u>53 °C</u>		
Elongation	2,5 min	72 °C		
Denaturierung	10 s	94 °C		
Annealing	1 min	44 °C		
Elongation	2,5 min	72 °C		
Elongation	5 min	72 °C		
Pause		4 °C		

PCR-Programm TAIL III:

Denaturierung	10 s	94 °C	←	20x
Annealing	1 min.	44 °C		
Elongation	2,5 min.	72 °C		
Elongation	5 min.	72 °C		
Pause		4 °C		

2.9.8 Sanger-Sequenzierung

Sequenzierungen wurden von der Firma Starseq GmbH (Mainz, Deutschland) durchgeführt. Der Sequenzierungsansatz bestand aus 1 μL der zu sequenzierenden Nukleinsäure, 5 μL ddH₂O und 1 μL Oligonukleotide zur Amplifikation des gewünschten Fragmentes. Die Analyse der resultierenden Sequenzierungsergebnisse erfolgte unter Verwendung von SeqMan Pro (DNASTAR ® Software for Lifesciences). Anhand der Chromatogramm-Analyse wurden nicht verwendbare Bereiche aus der Auswertung entfernt.

Zur Analyse einer durch CRISPR/Cas9-induzierten Modifikation der Kandidatengene wurden die Bereiche der gRNA durch PCR amplifiziert. Zu unterscheiden sind vier Modifikationstypen (Bruegmann *et al.*, 2019): (1) homozygot: Identische Modifikation in beiden Allelen; (2) heterozygot monoallelisch: Modifikation, bei der nur eines der beiden Allele modifiziert ist und das andere Allel dem Wildtyp entspricht; (3) heterozygot biallelisch: Modifikation beider Allele aber auf unterschiedliche Weise und (4) chimäre: Modifikation, die einer heterozygoten Modifikation ähnlich ist, aber durch überlagerte Sequenzen mit drei Nukleotiden an einer einzelnen Position im Chromatogramm zu erkennen sind (Abbildung 2.7).

2 Material und Methoden

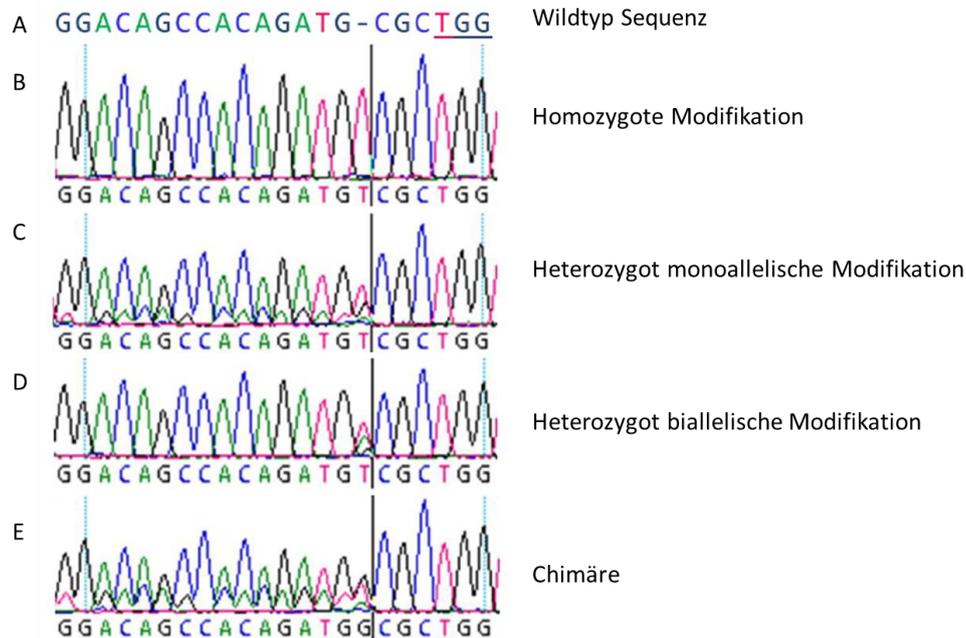


Abbildung 2.7: Chromatogramme der vier verschiedenen Modifikationsmöglichkeiten durch CRISPR/Cas9 in Pappel (aus Bruegmann *et al.*, 2019).

Dargestellt sind die durch CRISPR/Cas9 erzeugten Veränderungen im Pappelgenom an einer spezifischen Target-Sequenz. A: Wildtypsequenz mit unterstrichener PAM-Erkennungssequenz, die Position der Modifikation 3 Nukleotide vor der PAM-Erkennungssequenz ist durch einen senkrechten Strich gekennzeichnet. B: Homozygote Modifikation, entstanden durch identische Insertion bzw. Deletion eines oder mehrerer Nukleotide. C: Heterozygot monoallelische Modifikation erkennbar durch zwei Sequenzen im Chromatogramm hervorgerufen durch eine Modifikation auf nur einem der beiden Allele, sodass die Wildtypsequenz noch vorhanden ist. D: Heterozygot biallellische Modifikation durch unterschiedliche Modifikationen auf beiden Allelen, ohne Wildtypsequenz. E: Die Chimäre zeichnet sich durch drei verschiedene Kurven, entsprechend drei Nukleotiden an einer Position im Chromatogramm aus.

2.10 Expressionsanalysen

2.10.1 Qualitätsnachweis der RNA

Zum Qualitätsnachweis der aus pflanzlichem Gewebe extrahierten RNA wurden am Bioanalyser Aligent2100 (Aligent Technologies, Santa Clara, USA) die RIN-Werte „*RNA Integrity Number*“ bestimmt. Die RIN-Werte beschreiben den Grad an degradierte RNA. RNA dient in der Zelle als Informationsgrundlage für die zu synthetisierenden Proteine und ist in isolierter Form sehr anfällig gegenüber RNasen, die einen Abbau der RNA bedingen. Die bereits teilweise oder vollständig abgebaute RNA kann folgende Versuche beeinflussen (Schroeder *et al.*, 2006). Die RIN-Werte können ganze Werte von 1–10 annehmen, wobei RIN 1 gänzlich degradierte RNA und RIN 10 intakte RNA angibt (Schroeder *et al.*, 2006).

Die zu analysierende RNA wurde auf eine Konzentration unter 500 ng/μL eingestellt. Während der Vorbereitung des Bioanalyzers und der Chips wurde die RNA auf Eis gehalten. Die Elektroden des Bioanalyzers wurden gereinigt und anschließend bei offenem Deckel getrocknet. Um die Gelmatrix für den Chip vorzubereiten, wurden 550 μL der Aligent RNA 6000 Nano Gel Matrix in einen *Spin*-Filter gegeben und für 10 min bei 4380 rpm zentrifugiert (Heraeus Pico 17, Thermo Scientific, Waltham, USA). Von der gefilterten Matrix wurden 65 μL mit 1 μL Farbstoff-Konzentrat versetzt, kräftig gemischt und für 10 min bei 12.900 rpm zentrifugiert. Das lichtempfindliche Farbstoff-Konzentrat wurde nach der Zentrifugation im Dunkeln gehalten. Während der Zentrifugation wurden die RNA-Proben bei 70 °C für 2 min denaturiert. Im Anschluss wurde der Chip in die *Priming*-Station eingelegt, 9 μL des Farbstoff-Matrix-Mixes in die Öffnung G des Chips gegeben und mittels der Spritze verteilt. In die zwei Vertiefungen oberhalb der Öffnung G wurden jeweils 9 μL des Farbstoff-Matrix-Mixes gegeben. Der RNA 6000 Nano Marker wurde kräftig gemischt und 5 μL in die Öffnung mit dem Leitersymbol und die 12 Probenöffnungen gegeben. Dabei musste beachtet werden, dass keine der Öffnungen leer blieb. Im Anschluss wurde 1 μL Marker in die Öffnung mit dem Leitersymbol gegeben. Für die Analyse der Proben wurde je Öffnung 1 μL der RNA-Probe pipettiert. Im Folgenden wurde der Chip im IKA® MS3 (Jahnke und Kunkel Labortechnik, Staufen im Breisgau, Deutschland) für 60 s bei 2400 rpm kräftig geschüttelt und in den Bioanalyser eingesetzt. Nach erfolgter Messung wurde der Bioanalyser erneut gereinigt. Anhand des Elektropherogramms wurde der Degradationsgrad der eingesetzten Probe bestimmt. Die Bestimmung der RIN-Werte erfolgte für RNA-Proben, die für Real-

Time PCR-Analysen verwendet wurden, dabei wurden grundsätzlich nur RNA-Proben verwendet, deren RIN-Werte im Bereich von 7–10 lagen.

2.10.2 cDNA-Synthese

Zur Erzeugung von komplementärer DNA (cDNA) auf Grundlage von RNA durch reverse Transkription wurde das GoScript™ Reverse Transcription Mix Kit unter Verwendung von Oligo(dT) von Promega (Promega Cooperation, Madison, USA) genutzt. Die Anwendung erfolgte nach Herstellerangaben. Alle Komponenten wurden auf Eis aufgetaut, vorsichtig gemischt und kurz zentrifugiert. Für jede cDNA-Synthese wurde zunächst der GoScript™ Reverse Transcription Mix im 10 µL Ansatz hergestellt.

Reverse Transkription-Mix (10 µL)	
4 µL	Nuklease-freies Wasser
4 µL	GoScript™ <i>Reaction Buffer</i> , Oligo(dT)
2 µL	GoScript™ <i>Enzyme Mix</i>

Dem GoScript™ Reverse Transcription Mix wurden bis zu 5 µg gesamt RNA hinzugefügt, auf ein Gesamtvolumen von 20 µL mit Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt und durch Pipettieren vorsichtig gemischt. Die cDNA-Synthese erfolgte im Anschluss im Thermocycler SensoQuest (biolab products, Göttingen, Deutschland) nach folgendem Protokoll.

cDNA-Synthese Programm			
Annealing	5 min.	25 °C	↓ 1x
Elongation	60 min.	42 °C	
Inaktivierung	15 min.	70 °C	
Pause		4 °C	

Die resultierende cDNA wurde bei -20 °C gelagert oder direkt für den Nachweis von genomischer DNA eingesetzt. Zum Nachweis, dass der cDNA-Synthese ausschließlich RNA als Matrize diente, wurden Oligonukleotide verwendet, die ein Intron überspannten. Bei der Synthese des Fragmentes werden für cDNA und DNA in diesem Fall zwei unterschiedlich große Amplikons erzeugt. Ist in den Proben lediglich cDNA enthalten, wird ein kleineres Fragment amplifiziert, da Introns bei der Prozessierung zur RNA entfernt werden. Eine Kontamination mit DNA wäre im Agarosegel deutlich zu erkennen, da zusätzlich zu dem kleinen ein größeres Fragment nachweisbar wäre. Für den cDNA-Nachweis wurden die Oligonukleotide #2609 und #2610 verwendet. Das resultierende Amplikon von Potri.005G198700 ist bei DNA-Kontamination 721 bp groß. Die gewählten Oligonukleotide binden weiterhin mit einem *Mismatch* in Potri.002G06500 und erzeugen bei vorhandener DNA ein Fragment von 501 bp. Durch die Prozessierung der RNA beider Gene entstehen

2 Material und Methoden

jedoch Amplikons mit identischer Größe von 293 bp (Abbildung 2.8). Nach der Bestätigung, dass reine cDNA vorlag, konnte die cDNA für weitere Analysen eingesetzt werden.

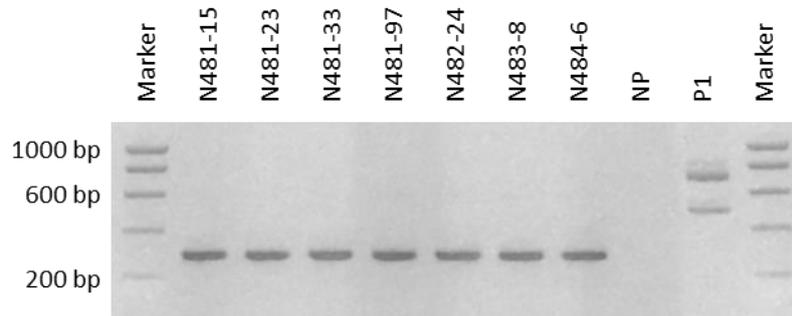


Abbildung 2.8: Agarosegelbild zum DNA-Test

Agarosegel nach cDNA-Synthese und Amplifikation von *UBIQUITIN* mit den Oligonukleotiden #2609 und #2610. Bei einer Amplifikation von DNA werden zwei Fragmente in der Größe von 721 bp und 501 bp erwartet. Ist ausschließlich cDNA vorhanden wird ein Fragment der Größe 293 bp amplifiziert. N48x-xx: Regenerat der N48x-Transformation; Marker: SmartLadder (Eurogentec, Belgien); NP: ohne DNA-Matrize.

2.10.3 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR diente dazu, um in Echtzeit Transkriptmengen zu analysieren und zu quantifizieren. In diesem Zuge wird die Transkriptmenge von einem Gen von Interesse über die Real-Time PCR amplifiziert und die Transkriptmenge in Relation zu einem Referenzgen berechnet. Als Referenzgene dienen Gene, die konstitutiv in der Pflanze exprimiert sind. Bevor die Expressionsanalyse durchgeführt werden kann, müssen Oligonukleotide erzeugt werden, die optimal funktionieren. Hierzu sind zunächst Oligonukleotideffizienztests nötig. Die Oligonukleotideffizienztests sowie die Expressionsanalyse erfolgten mit dem innuMIX qPCR DSGreen Standard Mastermix (Analytik Jena, Jena, Deutschland) im 20 μ L Ansatz. In den Oligonukleotideffizienztests wurde 1 μ L cDNA in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt, um eine Eichkurve zu erzeugen. Für die Expressionsanalysen wurden 5 μ L cDNA mit einer Konzentration von 3 ng/ μ L eingesetzt.

20 μ L Ansatz

10 μ L	2x innuMIX qPCR DSGreen Standard
1 μ L	5'Oligonukleotid (10 μ M)
1 μ L	3'Oligonukleotid (10 μ M)
1 μ L / 5 μ L	cDNA-Matrize
ad. 20 μ L	ddH ₂ O

2 Material und Methoden

Damit alle Proben einheitlich waren, wurde für die Real-Time PCR ein spezielles Pipettierschema angewandt (siehe Abbildung 2.9). Hierzu wurde für alle Ansätze der Mastermix mit ddH₂O vermischt. Im nächsten Schritt wurde aus diesem Mix die nötige Menge für die verschiedenen Oligonukleotidkombinationen entnommen und die jeweiligen Oligonukleotide hinzugegeben. Aus der Mischung, bestehend aus Mastermix, Oligonukleotiden und ddH₂O, wurde die nötige Menge entnommen, um sie mit der zu untersuchenden cDNA zu vermischen. Aus dem erstandenen Ansatz für die Real-Time PCR wurden je 20 µL pro Replikate entnommen und in die PCR-Gefäße überführt. Das beschriebene Pipettierschema sollte gewährleisten, dass Pipettierfehler minimiert werden und alle Triplikate identisch waren.

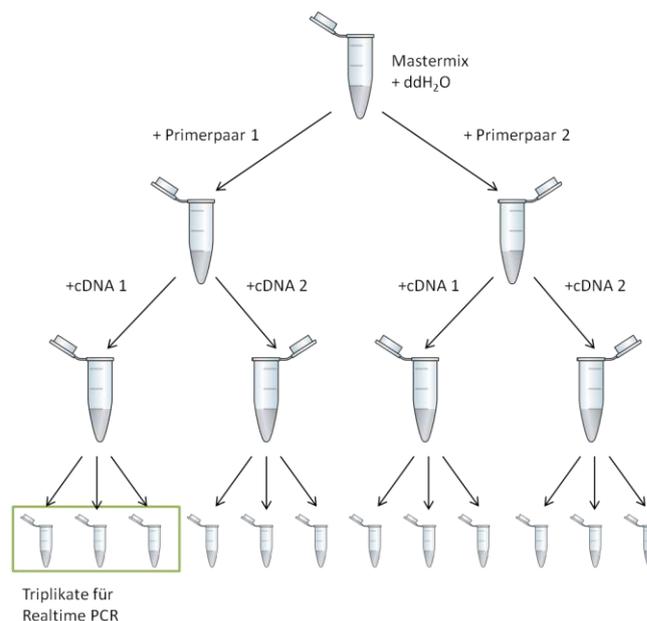


Abbildung 2.9: Pipettierschema für Real-Time PCR

Schematische Darstellung des durchgeführten Pipettierschemas zur Reduktion von Pipettierfehlern. (Abbildung des dargestellten Eppendorfgefäßes entnommen aus http://www.clker.com/cliparts/d/5/b/2/1195432651236937346eppendorf_opened__carlos_01.svg.med.png, 31.05.2019).

Die Real-Time PCR erfolgte im Real-Time-Thermocycler C-1000 Touch Thermal Cycler CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) nach folgendem Programm in 40 Zyklen. Der Nachweis, dass nur das gewünschte Amplikon erzeugt wurde, erfolgte anhand einer anschließenden Schmelzkurve, mit der die Länge der Fragmente bestimmt werden konnte. Eine Kontamination mit anderen Amplikons wäre durch einen oder mehrere zusätzliche Höchstwerte in den Kurvenverläufen erkennbar. Im Idealfall werden für die Real-Time PCR Oligonukleotide gewählt, die ein Intron einbinden. Eine Kontamination

2 Material und Methoden

mit genomischer DNA, wäre damit direkt in der Schmelzkurve durch einen weiteren Höchstwert bei höherer Temperatur sichtbar. Die verwendeten Oligonukleotide zur Analyse der Transkriptmengen der *NFP-like*-Gene, umschlossen bedauerlicher Weise kein Intron. Die Auswertung der gewonnenen Daten wurde unter Verwendung der Bio-Rad CFX Manager Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) durchgeführt.

Denaturierung	2 min	95 °C	
Denaturierung	30 s	95 °C	← 40x
Annealing und Detektion	1 min	58 °C	
Denaturierung	30 s	95 °C	
Schmelzkurve	5 s	58 °C ansteigend auf 95 °C	
Pause	30 s	8 °C	

2.10.3.1 Oligonukleotideffizienz

Vor der Expressionsanalyse der *NFP-like*-Kandidatengene in unterschiedlichen Geweben mussten Oligonukleotide mit optimaler Effizienz erzeugt werden. Oligonukleotid-effizienztests wurden für jede verwendete Oligonukleotidkombination durchgeführt. Die cDNA wurde in 5 Verdünnungen (unverdünnt, 1:5, 1:25, 1:125 und 1:625) in die Real-Time PCR eingesetzt, um eine Eichgerade erzeugen zu können. Der Oligonukleotid-effizienztest erfolgte mit dem innuMIX qPCR DSGreen Standard Mastermix (Analytik Jena, Jena, Deutschland) im 20 µL Ansatz in Duplikaten. Die gewonnenen Ct-Werte wurden für die folgenden Analysen gemittelt. Nach Transformation der Werte in eine logarithmische Skala konnten die Daten grafisch dargestellt werden. In Abbildung 2.10 ist die Eichgerade beispielhaft anhand der Oligonukleotidkombination (#2845 + #2846) zur Amplifikation von *NFP-like1* dargestellt. Die Steigung konnte über eine lineare Trendlinie errechnet werden.

2 Material und Methoden

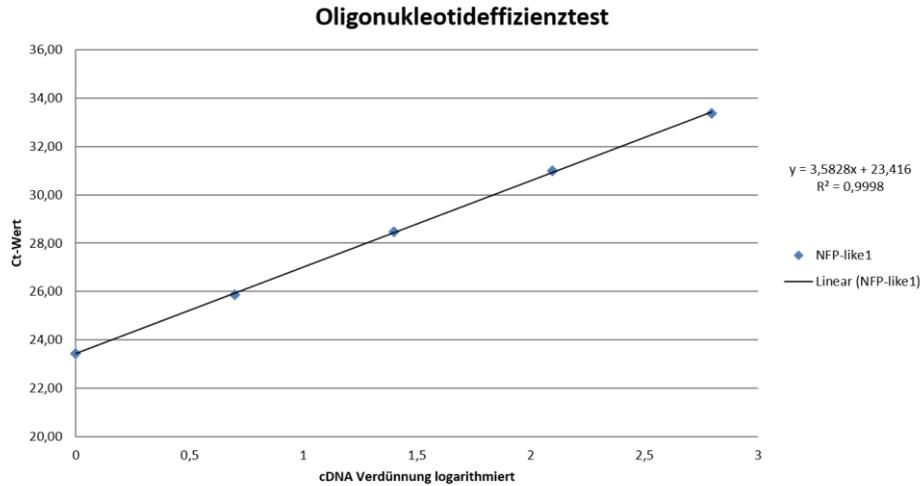


Abbildung 2.10: Grafische Darstellung der erhobenen Daten zum Oligonukleotid-effizienztest
 Dargestellt sind die erhobenen Daten zur Verdünnungsreihe für die Oligonukleotide #2845 + #2846 zur Amplifikation von *NFP-like1*.

Anhand der Steigung wurde die Effizienz der gewählten Oligonukleotide nach folgender Formel berechnet (Quelle: <https://steinbrenner-laborsysteme.de/qpcr-knowledge-center/qpcr-optimieren-und-testen/>, 09.07.2019):

$$\text{Effizienz: } 100 * \left(10^{\left(\frac{1}{\text{Steigung}} \right) - 1} \right)$$

In Tabelle 2.11 sind die gemittelten Ct-Werte der Oligonukleotid-effizienztest für die *NFP-like*-Kandidatengene und das Referenzgen *UBIQUITIN II (UBIQII)* angegeben.

Tabelle 2.11: Ct-Werte zur Berechnung der Effizienz der zur Real-Time PCR eingesetzten Oligonukleotide

Angegeben sind die gemittelten Ct-Werte nach Amplifikation der Zielgene in verschiedenen Verdünnungen. Berechnung des Logarithmus, der jeweiligen Verdünnung sowie die Steigung der Geraden und der daraus berechneten Effizienz des jeweiligen Oligonukleotidpaares. lg(x): Logarithmus (x) zur Basis 10; Verd.: Verdünnung; *UBIQII*: *UBIQUITIN II* (Potri.005G198700).

Verdünnung	lg (Verd.)	Transkript			
		<i>NFP-like1</i> (#2845+ #2846)	<i>NFP-like3</i> (#2814+ #2815)	<i>NFP-like4</i> (#2839+ #2840)	<i>UBIQII</i> (#575+ #576)
Unverdünnt	0	23,43	25,48	23,59	22,34
1/5	0,69897	25,85	28,17	25,90	24,82
1/25	1,39794001	28,46	30,26	29,82	28,94
1/125	2,09691001	31,00	32,45	31,08	30,13
1/625	2,79588002	33,37	35,03	33,24	32,07
	<u>Steigung</u>	-3,5828	-3,3448	-3,5025	-3,5411
	<u>Effizienz</u>	90,2 %	99 %	93 %	91,6 %

2.10.3.2 Auswertung der Real-Time PCR

Nach erfolgter Real-Time PCR wurden die erhobenen Daten ausgewertet. Hierzu wurden zunächst die Ct-Werte der Reaktion für die Triplikate miteinander verglichen. Abweichende Ct-Werte eines der Triplikate wurden für die nachfolgenden Analysen entfernt. Die Auswertung erfolgte nach Schmittgen *et al.* (2008) unter Verwendung der $2^{-\Delta Ct}$ -Methode. Dabei wurden die Ct-Werte der Triplikate für das Referenzgen und die *NFP-like*-Kandidatengene gemittelt. Die Bestimmung des ΔCt -Wertes erfolgte durch Subtraktion des gemittelten Ct-Wertes des Referenzgenes vom gemittelten Ct-Wert des Kandidatengenes. Der resultierende Wert wurde im Anschluss logarithmiert und zur Expressionsanalyse der Kandidatengene grafisch (2.14.1) unter Verwendung von RStudio durch das Grafikpaket ggPlot (Wickham 2009) dargestellt.

2.11 Versuche mit *Melampsora spec.*

2.11.1 Kultivierung von Sporenmaterial

Die Kultivierung von *Melampsora spec.* erfolgte in Anlehnung an Husson *et al.* (2013) in einer semi-feuchten Kammer. Zunächst wurden zwei Filterpapiere (Rundfilter MN640, 90 mm × 0,2 mm) in einer sterilisierten Glaspetrischale mit 1800 μL sterilem Leitungswasser befeuchtet, Blattmaterial von anfälligen Pappelklonen entnommen und mit der Blattunterseite nach oben auf das befeuchtete Filterpapier platziert. Zur Inokulation des Blattmaterials, wurde die Sporensuspension, bestehend aus *Melampsora*-Sporen in Agar-Wasser (0,1 g/L sterilen Leitungswassers), in mehreren 1 μL Tropfen pro Blatt mittels einer Pipette unter semi-sterilen Bedingungen aufgetragen. Die Sporensuspension wurde anschließend mit einem Apothekerspatel auf der Blattunterseite verstrichen.

Die Gewinnung neuer Sporen erfolgte nach einer Inkubation der Sporen auf dem Blattmaterial im RUMED[®] 1601 Wachstumsschrank (Rubarth Apparate GmbH, Laatzen, Deutschland) für 14 Tage bei 19 °C und einer dauerhaften Beleuchtung von 20 % (ca. 11 E m⁻² s⁻¹). Die bereits trockenen Sporen wurden über steriler Aluminiumfolie abgeklopft (Husson *et al.*, 2013), in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

2.11.2 Infektionsversuche mit *Melampsora spec.*

Zur Überprüfung der Anfälligkeit bzw. Resistenz von Pappelklonen unterschiedlicher Sektionen gegenüber verschiedener Pappelroste, wurden Infektionsversuche mit zwei unterschiedlichen *Melampsora spec.* durchgeführt. *Melampsora*-Sporen, die dem Stamm

Melampsora larici-tremulae angehören, wurden im Arboretum des Thünen Instituts für Forstgenetik, Großhansdorf, Deutschland, im Oktober 2016 von dreijährigen *P. × canescens* (P1), angehörig der Sektion *Populus*, entnommen. Der zweite verwendete *Melampsora*-Stamm *Melampsora larici-populina* (98AG31) wurde von Dr. Pascal Frey (INRA, University of Lorraine, Frankreich) zur Verfügung gestellt.

2.11.2.1 Vorbereitung der Sporensuspension

Am Vortag der Inokulation wurden die bei -20 °C gelagerten Sporen aufgetaut und in 100 µL Agar-Wasser resuspendiert. Um ein Anhaften der Sporen im Eppendorf-Reaktionsgefäß und den verwendeten Pipettenspitzen zu minimieren, wurde dem Agar-Wasser Tween20 hinzugegeben. In Vorversuchen zeigte sich, dass die Auskeimung der Pilzsporen durch Zugabe von Tween20 beeinflusst wird, sodass nur eine geringe Menge Tween20 eingesetzt werden konnte. Von der Tween20 Verdünnung (10 µL Tween20; 1500 µL 0,01 % Agar-Wasser) wurde 1 µL auf 100 µL Agar-Wasser gegeben, damit die Auskeimung der *Melampsora*-Sporen gewährleistet war.

Die Sporendichte wurde mit dem Fuchs-Rosenthal Hämocytometer bestimmt. Hierzu wurden 17 µL der Sporensuspension aufgetragen und alle Großquadrate mandänenförmig ausgezählt. Die Zählung erfolgte zweifach und anhand des aus beiden Zählungen resultierenden Mittelwertes konnte die Sporendichte je Mikroliter bestimmt werden. Die Sporendichte wurde auf 100 Zellen/µL für die Versuche eingestellt und die Sporensuspension über Nacht bei 4 °C gelagert.

Bestimmung der Zelldichte:

Anzahl Zellen*Verdünnung*0,3125 = Zellen je µL

2.11.2.2 Vorbereitung des Blattmaterials

Die Infektionsversuche erfolgten unter semi-sterilen Bedingungen in einer semi-feuchten Kammer. Als semi-feuchte Kammer dienten mit 1800 µL sterilem Leitungswasser befeuchtete, autoklavierte Glaspetrischalen (Steriplan, 100 mm x 20 mm), die je zwei Filterpapiere (Rundfilter MN640, 90 mm x 0,2 mm) enthielten. Die verwendeten Pappelklone unterschiedlicher Sektionen wurden 6 Wochen vor Beginn des Versuches als Kopfstecklinge in Magentadosen mit 460-Medium überführt. Um möglichst viele und große Blätter zu generieren, wurden pro Magentadose (Magenta GA-7 Vessel, Sigma-Aldrich, München) lediglich zwei Pflanzen angezogen. Am Tag vor dem Infektionsversuch wurden alle Blätter

einer Pflanze mit der Blattunterseite nach oben in die Glaspetrischale mit dem befeuchteten Filterpapier überführt und daraufhin mit Parafilm verschlossen. Bis zur Durchführung des Infektionsversuches wurden die Blätter im Wachstumsschrank unter oben genannten Bedingungen gehalten.

2.11.2.3 Infektionsversuche

Am Inokulationstag wurden zunächst die Blattunterseiten der Blätter in den Kontrollschalen mit Agar-Wasser (0,01 % Agar) inokuliert. Blätter bis zu einer Größe von 1 cm² wurden mit 1 µL Sporensuspension inokuliert, alle Blätter einer Größe von 2 cm² und größer wurden mit 2 µL Sporensuspension angeimpft. Auf Blätter einer Größe von 1,1 cm² bis 1,9 cm² wurden 1,5 µL Sporensuspension aufgetragen. Die Sporensuspension wurde mittig auf die Blattunterseite gegeben und mit einem Apothekerspatel verteilt. Nachdem alle Blätter der zu untersuchenden Pappelklone beimpft waren, wurden sie für 21 Tage im Wachstumsschrank inkubiert. Am 7. Tag, 14. Tag und 21. Tag nach Inokulation wurden die Blätter auf Sporenlager und andere sichtbare Infektionsmerkmale bonitiert (Abbildung 2.11). Fotografische Aufnahmen erfolgten an jedem Boniturtag. Zur Bestimmung der befallenen Fläche wurde diese in Prozent zur Gesamtfläche eines jeden Blattes iterativ abgeschätzt. In Tabelle 2.4 sind die Pappelklone, die für die Infektionsversuche mit *Melampsora larici-populina* und *Melampsora larici-tremulae* eingesetzt wurden, aufgeführt. Die in den Infektionsversuchen mit *Melampsora larici-tremulae* verwendeten transgenen Pappellinien sind in Tabelle 2.5 aufgelistet.

Die Versuchsansätze zur Analyse der Anfälligkeit bzw. Resistenz der transgenen Pappellinien gegenüber *Melampsora larici-tremulae* fanden zeitlich voneinander getrennt statt, sodass sie in drei verschiedene Versuchsansätze gegliedert wurden. Die Berechnungen erfolgten für die in dem jeweiligen Ansatz getesteten transgenen Linien immer zu dem im gleichen Ansatz inokulierten Kontroll-Klon P1.

Zur Analyse, ob die Verteilung der Sporenlager auf den transgenen Linien unterschiedlich zur nicht-transgenen Kontrolle war, wurden statistische Berechnungen unter Verwendung von RStudio (RStudio Inc.) durchgeführt. Der Shapiro-Wilk *Normality* Test wurde gewählt, um die Verteilung der Daten auf eine Normalverteilung, die für alle erhobenen Daten nicht gegeben war, zu überprüfen. Zum Vergleich der Verteilung von mit Sporenlagern bedeckter Blattfläche zweier Proben, dem nicht-transgenen Kontroll-Klon P1 mit einer beliebigen durch CRISPR/Cas9 modifizierten P1, wurde der Wilcoxon *Rank Sum* und *Signed Rank* Test (RStudio Inc.) verwendet. Der Wilcoxon *Rank Sum* und *Signed Rank* Test (RStudio Inc.) vergleicht die Mediane zweier Proben auf einen statistischen Unterschied.

2 Material und Methoden

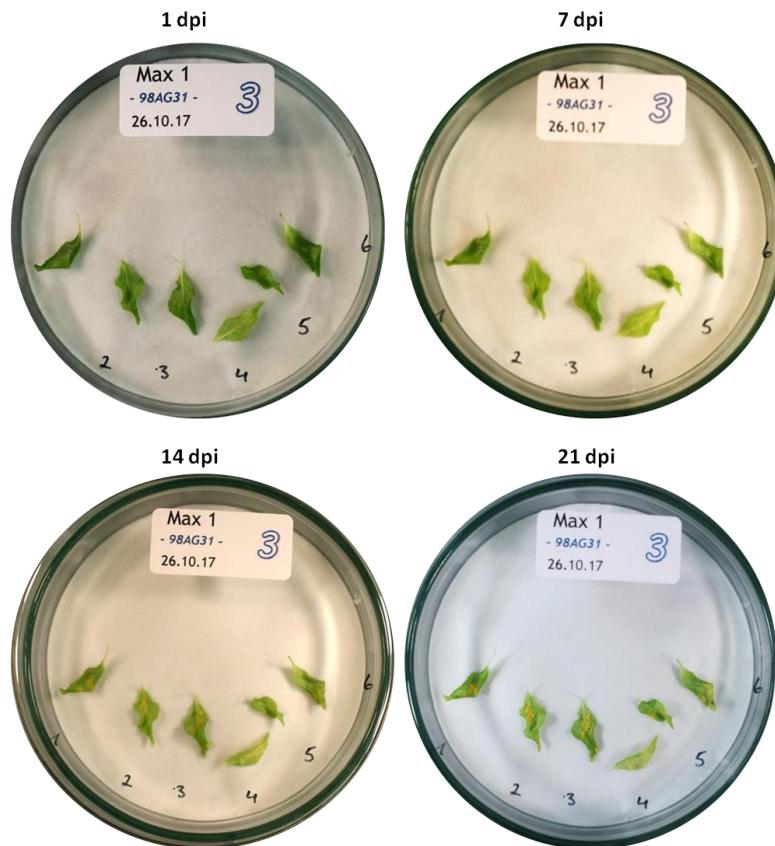


Abbildung 2.11: Fotografische Darstellung der Infektionsversuche an den Boniturtagen

Aufnahmen erfolgten an 4 Zeitpunkten nach der Inokulation. Tag 1 nach Infektion (1 dpi = *day post inoculation*), Tag 7 nach Infektion (7 dpi), Tag 14 nach Infektion (14 dpi) und Tag 21 nach Infektion (21 dpi). Dargestellt ist der Pappelhybrid Max1, der der Sektion *Aigeiros/Tacamahaca* angehört, der verwendete *Melampsora*-Stamm ist *Melampsora larici-populina* (98AG31).

2.12. Untersuchung von Pappelklonen im Gewächshaus

2.12.1 Überführung von Pflanzen der Gewebekultur in die Erdkultur

Zur phänotypischen Analyse von transgenen Pappellinien im Vergleich zum Kontroll-Klon *P. × canescens* (P1) wurden die Regenerate von der Sterilkultur in die Erdkultur im Gewächshaus überführt. Zur Überführung in die Erdkultur im Gewächshaus wurden ca. sechs Wochen alte Pappelklone oder transgene Pappellinien verwendet. Die Anzucht der Pflanzen bis zum Übergang ins Gewächshaus erfolgte in Pikierschalen mit einem Durchmesser von 5 cm. Das Gramoflor Profisubstrat (Gramoflor GmbH & Co. KG, Vecta, Deutschland), das vor der Verwendung für die kleinen Gewebekulturpflanzen durch Sieben von groben Bestandteilen getrennt wurde, diente als Erds substrat. Das gesiebte Erds substrat sowie der Deckel der Pikierschale wurden vor Überführung der Pflanzen aus der Gewebekultur befeuchtet. Auf Grund der hohen Feuchtigkeitsverhältnisse in den Magentadosen (Magenta

2 Material und Methoden

GA-7 Vessel, Sigma-Aldrich, München) mussten die Pflanzen, nachdem der Deckel geöffnet wurde, umgehend mit Leitungswasser besprüht werden, um ein Austrocknen zu verhindern. Mit einer Pinzette wurde das Medium um die Pflanze gelöst, die Pflanze kurz über dem Wurzelansatz mit der Pinzette fixiert und die Wurzeln vorsichtig aus dem Medium gezogen. Die Pflanze und Wurzeln wurden erneut mit Wasser besprüht, um ein Austrocknen zu verhindern. Von den feinen Wurzeln wurde sämtliches Medium entfernt und das Wurzelsystem mit einer Schere auf ca. 1 cm Länge eingekürzt. Vorsichtig wurden die Pflanzen in das Pflanzloch überführt, mit einem Pikierstab leicht festgedrückt und nochmals ausreichend mit Wasser besprüht (Abbildung 2.12). Im Weiss Klimaschrank (Weiss Umwelttechnik GmbH, Reiskirchen, Deutschland) erfolgte durch langsames Lüften das anschließende Abhärten der Pflanzen gegenüber den neuen Feuchtigkeitsverhältnissen.

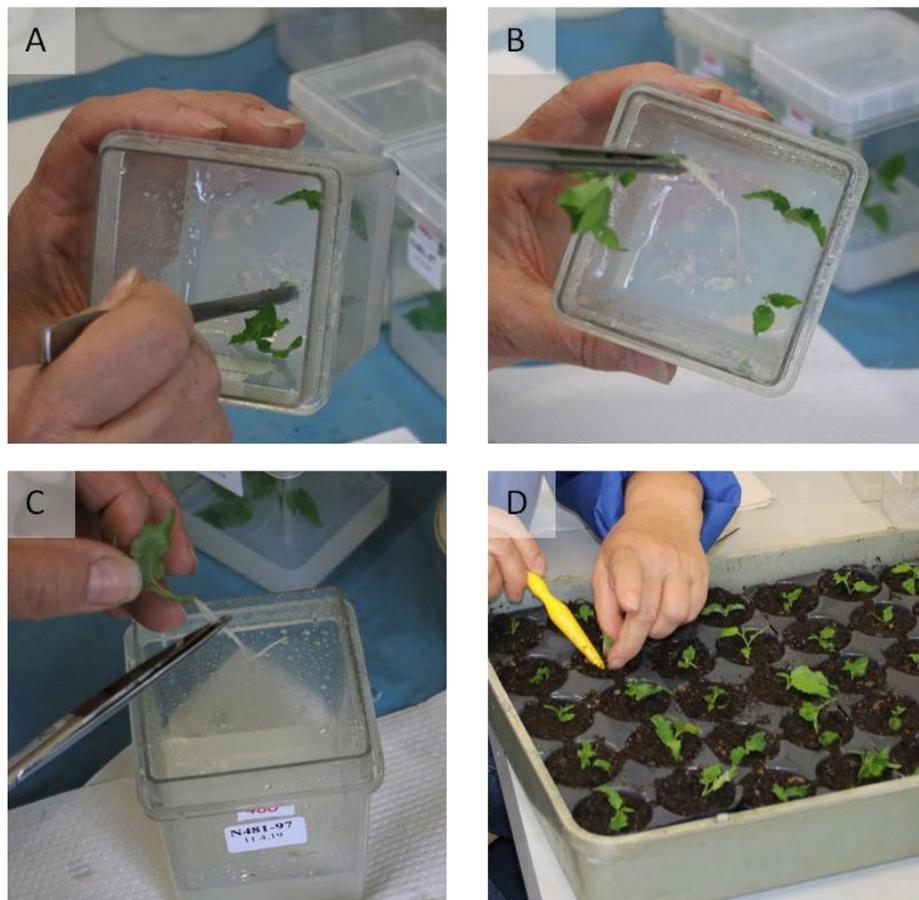


Abbildung 2.12: Überführung von Pflanzen aus der Sterilkultur in Erde

A: Auflockern des Mediums mittels einer Pinzette. B: Herausnehmen der Pflanze ohne die Wurzeln zu verletzen. C: Kürzen der Wurzeln auf ca. 1 cm Länge. D: Überführen der Pflanzen in Erde.

Nach der Überführung ins Gewächshaus wurden die verwendeten Pappelklone sowie die transgenen Linien, im Folientunnel gehalten und durch Öffnen des Tunnels den neuen Umgebungsverhältnissen angepasst. Die Tagestemperatur betrug mindestens 20 °C, bei

2 Material und Methoden

Sonneneinstrahlung wurde durch Lüften die Temperatur heruntergeregelt. Die Nachttemperatur wurde auf 20 °C gehalten. In regelmäßigen Abständen wurden die Pflanzen in neue, größere Töpfe überführt, bis sie in einem Endtopf von 19 cm Durchmesser verblieben. Eine Düngung mit 2–3 % Universol (Everris, Geldermalsen, Niederlande) erfolgte einmal pro Woche. Im Verlauf der Anzucht wurde die Nährstoffversorgung auf den Dünger Osmocote Exakt (ICL Deutschland Vertriebs GmbH, Nordhorn, Deutschland) umgestellt. Hierzu wurde den Töpfen je 2 Tabletten des Düngers Osmocote Exakt (ICL Deutschland Vertriebs GmbH, Nordhorn, Deutschland) zugefügt, sodass eine optimale Nährstoffversorgung für 6 Monate gewährleistet war. Weiterhin wurden die in Tabelle 2.12 aufgeführten Chemikalien zum Pflanzenschutz verwendet. Zu Beginn des Winters wurden die Pflanzen in ein Gewächshaus ohne weitere Beheizung überführt. Nach dem Blattverlust wurde die Höhe der Pflanzen erfasst und der Spross auf eine Höhe von 1 m gekürzt. Im Folgejahr verblieben die Pflanzen im Gewächshaus ohne Beheizung.

Tabelle 2.12: Pflanzenschutz im Gewächshaus

Angegeben ist die Konzentration des verwendeten Pflanzenschutzmittels sowie der zu unterdrückende Schädling.

Bezeichnung	Konzentration	Schädling
Calypso	0,1 %	Gallmücke
Daudadium	0,1 %	Gallmücke
Euvidor	0,04 %	rote Spinne
Magister	0,05 %	rote Spinne
Massai	0,02 %	rote Spinne
Milbe Knock	0,05 %	rote Spinne
Netzschwefel	0,25 %	Mehltau
Vertimec	0,04 %	rote Spinne

2.12.2 Mykorrhizierungsversuche im Gewächshaus

Zur Analyse einer veränderten Mykorrhizierung wurden die CRISPR/Cas9 modifizierten transgenen Pappellinien zunächst von Dr. Stephanie Werner (Julius-Kühn-Institut, Quedlinburg, Deutschland) *in vitro* auf ein verändertes Mykorrhizierungsverhalten getestet.

Um eine Veränderung der Mykorrhizierung in Erdkultur zu untersuchen, wurden Kopfstecklinge der zu untersuchenden transgenen Pappelregenerate auf 460-Medium angezogen. Nach 15 Tagen Wachstum wurden die Pappelpflanzen in gesiebte Erde überführt. Die Erde wurde zuvor 2,5 h auf 121 °C erhitzt, um sicherzustellen, dass keine Mikroorganismen in der Erde vorhanden waren. Die Pflanzen wurden wie in 2.12.1 beschrieben in die autoklavierte Erde überführt.

2 Material und Methoden

Die Pflanzen wurden für 3 Tage im Gewächshaus in einer Pikierschale mit Deckel gehalten, bevor sie unter dem Folientunnel ohne Deckel abgehärtet wurden. Zum weiteren Abhärten der Pflanzen im Gewächshaus, wurde der Folientunnel am 12. Tag nach der Überführung in Erde geöffnet. Am 15. Tag im Gewächshaus hatten sich die Pflanzen ausreichend akklimatisiert und konnten für den Mykorrhizierungsversuch in Pflanztöpfe mit einem Durchmesser von 19 cm überführt werden. Es wurde erneut autoklavierte Erde verwendet, um eine Kontamination mit Mikroorganismen zu verhindern. Insgesamt 15 Pflanzen pro Linie wurden mit 20 mL Mykorrhiza-Substrat INOQ Forst (INOQ GmbH, Schnega, Deutschland) angeimpft. Das Substrat wurde in das Pflanzloch gegeben und die Wurzeln der Pflanze direkt auf das Substrat positioniert. Weitere 15 Pflanzen der gleichen Linie wuchsen in autoklavierter Erde ohne Zugabe des Mykorrhiza-Substrats (Abbildung 2.13).



Abbildung 2.13: Fotografische Darstellung der Animpfung mit und ohne Mykorrhiza-Substrat
Links: Animpfung ohne Mykorrhiza-Substrat: Die Pflanze wird direkt in das vorbereitete Pflanzloch überführt. Rechts: Animpfung mit Mykorrhiza-Substrat: In das vorbereitete Pflanzloch wird 1 Löffel (20 mL) des Mykorrhiza-Substrats gegeben und im Anschluss die Pflanze direkt auf das Mykorrhiza-Substrat überführt.

Für die Versuchsdauer von 6 Monaten wurden die Pflanzen in den Töpfen belassen und auf Düngung verzichtet. Um eine Kontamination mit anderen Mikroorganismen zu verhindern, befanden sich Untersetzter unter den Pflanztöpfen. Zur Vermeidung von Positionseffekten wurden die verschiedenen Linien unwillkürlich aufgestellt. Der Versuch wurde unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt. Die Temperatur am Tage betrug mindestens 15 °C und erhöhte sich je nach Sonneneinstrahlung, die minimale Nachttemperatur betrug ebenfalls 15 °C. Die erste Bonitur der Pflanzhöhe erfolgte vier Wochen nach der Überführung der Pflanzen in die Endtöpfe. Die Höhenmessung der Pflanzen wurde einmalig pro Monat durchgeführt. Nach den ersten fünf Wochen wurde der Abstand zwischen den Pflanzen von 25 cm auf 35 cm erhöht.

2.12.3.1 Phänotypische Merkmalsanalyse von Gewächshauspflanzen

Zur Auswertung eines durch Mykorrhizierung hervorgerufenen Effektes auf das Wachstum der Pappeln wurden verschiedene phänotypische Merkmale der Pflanzen untersucht. Die Bonitur verschiedener im Folgenden genannter phänotypischer Merkmale erfolgte nach einer 7-monatigen Wachstumsphase im Gewächshaus unter kontrollierten Bedingungen. Neben der Höhenmessung wurde der Durchmesser der Pflanze (ca. 1 cm über dem Pflanzloch) gemessen sowie das Frischgewicht und die Anzahl der Blätter bestimmt. Das Trockengewicht wurde nach Trocknung der Holzproben bei 105 °C für 16 h (Bruegmann *et al.*, 2019) ermittelt. Weiterhin wurden die Wurzeln mikroskopisch auf Mykorrhizen untersucht. Zur Absicherung der beobachteten mykorrhizierten Wurzelstrukturen wurden diese zur DNA-Isolation eingesetzt (2.8.2). Der Nachweis pilzlicher DNA erfolgte durch Amplifikation der ITS-Regionen.

2.13 Mikroskopische Techniken

Zur mikroskopischen Analyse sowie der Auszählung von *Melampsora*-Sporen wurde das Mikroskop Olympus BH-2 (Olympus Life Science, Hamburg, Deutschland) genutzt. Weiterhin wurde das Stereomikroskop 2000-C (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) für mikroskopische Untersuchungen der mykorrhizierten Wurzelspitzen verwendet.

2.14 Computergestützte Analyse und Auswertung

Zur Analyse der durch Sequenzierung erfolgten Chromatogramme wurde die Software SeqMan Pro (DNASTAR® LASERGENE®) genutzt. Die Darstellung von Vektorkarten sowie die Auswahl geeigneter Restriktionsenzyme für Southern-Blot-Analysen erfolgte mittels des Seqbuilder (DNASTAR® LASERGENE®). Weiterhin wurde das *Webtool Expaty*

translate (<https://web.expasy.org/translate/>) zur Auswertung der Proteinsequenz mit vorhandener Transkriptsequenz genutzt. Die Analyse der möglichen Proteinstruktur der Kandidatengene und modifizierten transgenen Regenerate erfolgte mittels *SMART Protein prediction* (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?GENOMIC=1) unter Verwendung des „*Genomic Mode*“. Bei der Berechnung einer möglichen Proteinstruktur wurden Signalpeptide, interne Wiederholungen, PFAM-Domänen und Homologe bekannter Strukturen berücksichtigt. Die Analyse der gRNA-Struktur erfolgte anhand des *RNAfold-Webservers* (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) unter Verwendung des Andronescu-Modells (Andronescu *et al.*, 2007) und dem Algorithmus zur minimalen freien Energie (MFE) von Zucker *et al.* (1981). Zur Analyse möglicher OFF-Targets wurde das *Webtool CRISPR-P* (<http://crispr.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR2/CRISPR>) verwendet.

2.14.1 Statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse der Infektionsversuche mit *Melampsora spec.* und der Mykorrhizierungsversuche wurde RStudio (RStudio Inc.) verwendet. Zur statistischen Auswertung der Infektionsversuche mit *Melampsora spec.* wurde die Verteilung der Daten zunächst auf eine Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk *Normality*-Test überprüft. Zum Vergleich der Verteilung von mit Sporenlagern bedeckter Blattfläche zweier Proben, dem nicht-transgenen Kontroll-Klon *P. × canescens* (P1) mit einer beliebigen durch CRISPR/Cas9 modifizierten P1, wurde der Wilcoxon *Rank Sum* und *Signed Rank* Test verwendet. Es sollte überprüft werden, ob die Verteilung der Daten statistisch als signifikant unterschiedlich oder nicht unterschiedlich zu werten war. War der errechnete p-Wert kleiner als 0,05 wurde die Hypothese, dass die Daten identisch sind, verworfen und die Alternativhypothese, dass die Daten unterschiedlich sind, angenommen. Die grafische Darstellung der erhobenen Daten erfolgte unter Verwendung des Pakets ggPlot (Wickham, 2009).

3 Ergebnisse

3.1 *In silico*-Auswahl Chitin-bindender Kandidatengene in der Gattung *Populus*

Die Untersuchung von Lysin-Motiv-Rezeptor-ähnlichen Kinasen (LysM-RLKs) als Kandidatengene in der Pappel und die Bestimmung ihrer Funktion ist Hauptbestandteil der vorliegenden Arbeit. In *P. trichocarpa* konnten durch phylogenetische Studien (Dr. Elena Petutschnig, Plant Cell Biology, Universität Göttingen, Deutschland) 19 LysM-RLKs identifiziert werden (Abbildung 3.1). Weiterhin wurden vier homologe Nod-Faktor-Rezeptoren bestimmt, die in Leguminosen bei der Ausbildung einer Symbiose mit Rhizobien (stickstofffixierenden Bakterien) beteiligt sind. Die durch phylogenetische Analyse identifizierten LysM-RLKs ließen sich anhand ihrer Struktur in folgende drei funktionelle Gruppen gliedern: (1) Chitinbindung und aktive Kinase, (2) Chitinbindung und inaktive Kinase, (3) Symbiose. Im Folgenden soll die Funktion der vier zu Nod-Faktor-Rezeptoren homologen Gene, die sich in die funktionelle Gruppe der Symbiose gliedern lassen, analysiert werden.

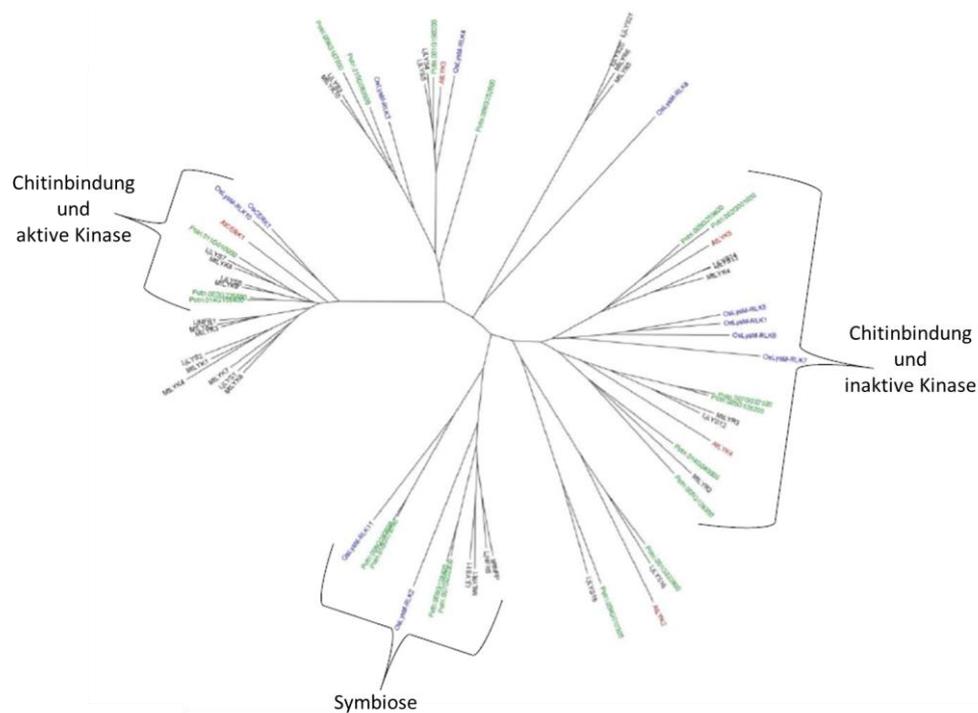


Abbildung 3.1: Phylogenetischer Baum der LysM-Proteine

Phylogenetischer Baum der LysM-Proteine in *Arabidopsis*, *Populus*, *Medicago*, Reis und *Lotus*. Die LysM-Proteine sind nach ihrer Struktur in drei Gruppen gegliedert: (1) Chitinbindung und aktive Kinase, (2) Chitinbindung und inaktive Kinase, (3) Symbiose. Phylogenetische Analyse von Dr. Elena Petutschnig, Plant Cell Biology, Universität Göttingen, Deutschland.

3.1.1 Übertragbarkeit der *NFP-like*-Kandidatengene auf *Populus*

In *P. trichocarpa* lagen nach der funktionalen Vorhersage (Dr. Elena Petutschnig, Plant Cell Biology, Universität Göttingen, Deutschland) der LysM-RLKs zwei Gene (Potri.008G160600 und Potri.010G078700) vor, die sich mit dem Ortholog *OsLysM-RLK11* aus Reis gruppieren (Abbildung 3.1). Zwei weitere Gene, Potri.005G128400 und Potri.007G032300, gruppieren sich mit dem Ortholog *LjLYS11* und *LjNFR5* aus *Lotus* sowie *MtLYR1* und *MtNFP* aus *Medicago* (Abbildung 3.1). Dementsprechend wurde vermutet, dass diese Gene bei der Ausbildung einer Symbiose mit mykorrhizierenden Pilzen involviert sind. Die in *P. trichocarpa* als homologe Nod-Faktor-Rezeptoren bestimmten Gene sollten auf ihre Funktion hin analysiert und mittels CRISPR/Cas9 modifiziert werden. Die zu untersuchenden Gene, die für die Nod-Faktor-Rezeptoren kodieren, liegen im *P. trichocarpa* Genom in zweifacher Form als paraloge Paare vor. Insgesamt wurden vier Gene ausgewählt: *NFP-like1* (Potri.005G128400), *NFP-like2* (Potri.007G032300), *NFP-like3* (Potri.008G160600) und *NFP-like4* (Potri.010G078700). Dabei bilden *NFP-like1* und *NFP-like2* sowie *NFP-like3* und *NFP-like4* ein paraloges Paar mit vermutlich gleicher Funktion.

3.1.2 Kandidatengen *NFP-like2* ist in *P. × canescens* nicht vorhanden

Um eine durch CRISPR/Cas9 in den Kandidatengenen generierte Modifikation nachzuweisen, wurden Oligonukleotide erzeugt, die den Bereich der gRNA im Pappelklon INRA 717-1B4 (*P. × canescens*, als P1 bezeichnet) amplifizierten. Die Sequenzen der Kandidatengene von *Populus trichocarpa* wurden in der Datenbank PopGenIE (<http://popgenie.org/blast>; 18.05.17) durch eine *Blast*-Suche identifiziert. In PopGenIE (<http://popgenie.org/blast>) wurde hierzu die Genomsequenz von *P. tremula* als Referenzgenom gewählt, da P1 ein Hybrid aus *Populus tremula* und *Populus alba* ist und somit ein Eindruck über die vorliegende Gensituation gewonnen wurde. Entgegen der These, dass zwei Genloci bei der Suche nach *NFP-like1* und *NFP-like2* im *P. tremula* Genom vorhanden sind, war nur ein einzelner übereinstimmender Bereich im *P. tremula* Genom nachweisbar. Die *Blast*-Suche von *NFP-like2* resultierte in dem identischen Ergebnis wie *NFP-like1*.

Um zu überprüfen, ob das Kandidatengen *NFP-like2* in P1 vorhanden ist, wurde eine weitere Datenbank zur *in silico*-Analyse verwendet. In der Urgi Datenbank (<https://urgi.versailles.inra.fr/Species/Forest-trees/Populus/Clone-INRA-717-1B4/>) ist das Genom des Pappelklons INRA 717-1B4 hinterlegt, sodass eine erneute *Blast*-Suche von *NFP-like2* erfolgte (Oktober 2017) und die Ergebnisse in SeqMan Pro (DNASTAR® Software for Lifesciences) analysiert wurden. Die resultierenden Sequenzen von *NFP-like2* entsprachen

3 Ergebnisse

denen von *NFP-like1*. Dies ist ein Hinweis darauf, dass *NFP-like2* weder auf dem Alba-Allel noch auf dem Tremula-Allel in der verwendeten P1 vorhanden ist.

Zur Verifizierung dieser Vermutung wurde auf Sequenzen einer weiteren Datenbank, der Tsai AspenDB (<http://aspendb.uga.edu/index.php/databases/spta-717-genome>; 18.05.17) zum Nachweis von *NFP-like2* zurückgegriffen. Die genannte Datenbank gibt ebenfalls das Genom von P1 wieder. Anhand der Potri-Nummern von *Populus trichocarpa* konnte die Sequenz des Tremula- und Alba-Allels für P1 entnommen werden. Die Sequenzen von *NFP-like2* für *P. tremula* und *P. alba* waren zu 100 % identisch zueinander und wichen ebenfalls nicht von der *P. trichocarpa*-Sequenz von *NFP-like2* in Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) ab. Der Umstand, dass keine Sequenzunterschiede in *NFP-like2* in den genannten drei Arten vorlagen, ist höchst unwahrscheinlich, da zumindest *P. trichocarpa* einer anderen Sektion angehört ist. Ebenso wäre ein Unterschied zwischen *P. tremula* und *P. alba* zu erwarten gewesen.

Auf Grund der widersprüchlichen Ergebnisse zum Vorhandensein von *NFP-like2* in der Urgi Datenbank und der Tsai AspenDB (<http://aspendb.uga.edu/index.php/databases/spta-717-genome>) wurden Oligonukleotide auf Grundlage der Sequenzen von *NFP-like1* und *NFP-like2* von Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>; 14.12.16) erzeugt, die in *NFP-like2* binden und möglichst viele Sequenzunterschiede (*Mismatches*) zu *NFP-like1* aufweisen (Abbildung 3.2).



Abbildung 3.2: Alignment von *NFP-like1* und *NFP-like2* in *P. trichocarpa*

Teilalignment der Kandidatengene *NFP-like1* und *NFP-like2* zur Erzeugung spezifischer Oligonukleotide für *NFP-like2*, die möglichst viele Sequenzunterschiede zu *NFP-like1* aufweisen (roter Kasten). A: forward Oligonukleotid #2393 bei Position 129–151, B: reverse Oligonukleotid #2394 bei Position 569–590, resultierendes Fragment 461 bp.

3 Ergebnisse

In Abbildung 3.3 sind die Agarosegelbilder nach erfolgter Gradienten-PCR mit den Oligonukleotiden #2393 und #2394 dargestellt, die in *NFP-like2* binden und möglichst viele *Mismatches* zu *NFP-like1* aufweisen. Zusätzlich zu dieser Oligonukleotidkombination wurden noch zwei weitere Kombinationen getestet, die ebenfalls in Abbildung 3.3 dargestellt sind. Zum Nachweis, dass die PCR grundsätzlich funktionierte, wurde als Kontrolle ein *P. trichocarpa*-Klon, die als Nisqually bezeichnet wird, mit einbezogen. Mit den Oligonukleotiden #2324 und #2325 konnte kein Amplikon erzeugt werden, weder für P1 noch für Nisqually. Unter Verwendung der Oligonukleotide #2393 und #2394 konnte für P1 kein Amplikon erzeugt werden, jedoch für den Kontroll-Klon Nisqually. Gleiches wurde für die Oligonukleotide #2326 und #2327 beobachtet. Die Amplifikation der Bereiche von *NFP-like2* resultierte in keinem Fragment, weder *NFP-like1* noch eines anderen Gens oder Teilbereiches des Genoms.

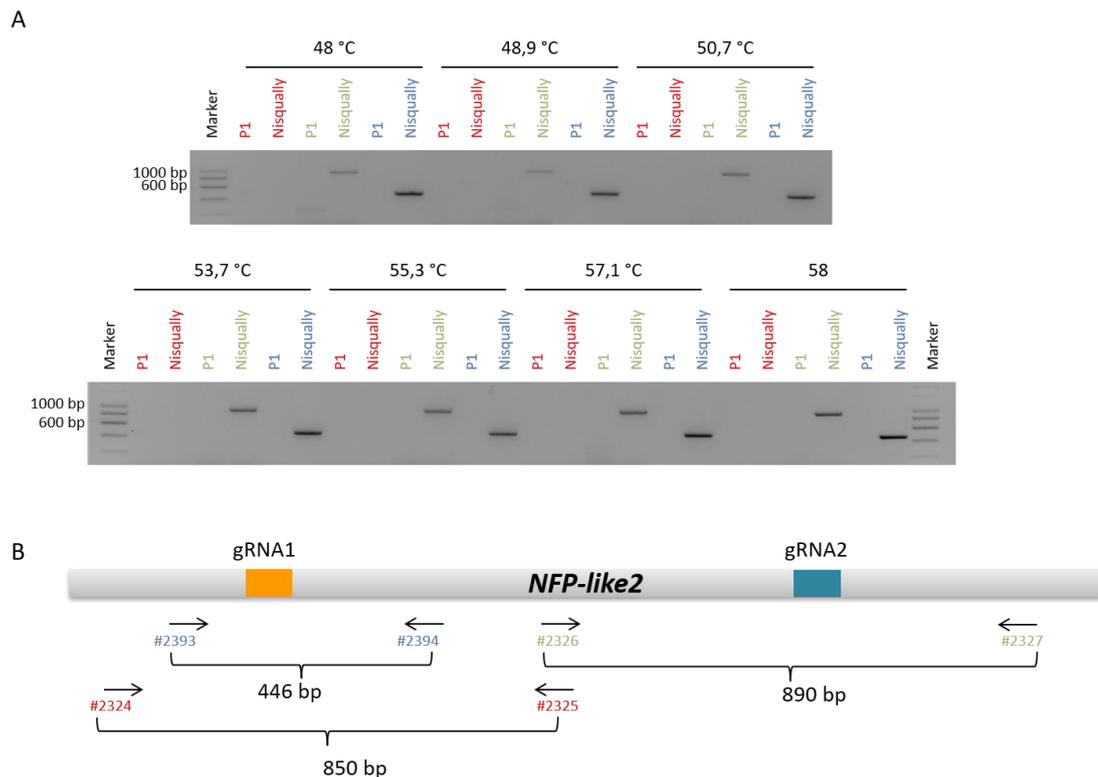


Abbildung 3.3: PCR-Strategie zum Nachweis von *NFP-like2* in P1 und Nisqually

A: Agarosegelbilder der Gradienten-PCR zum Nachweis von *NFP-like2* in den Pappelklonen P1 und Nisqually. Rot: Oligonukleotide #2324 und #2325, erwartetes Fragment: 850 bp; grün: Oligonukleotide #2326 und #2327, erwartetes Fragment: 890 bp; blau: Oligonukleotide #2393 und #2394, erwartetes Fragment: 446 bp, Marker: SmartLadder (Eurogentec, Belgien). B: Schematische Darstellung von *NFP-like2* nach der Annotation aus Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). Angegeben sind die Positionen der verwendeten Oligonukleotide sowie die Länge des zu erwartenden PCR-Produktes.

3.2 Expressionsanalyse der *NFP-like*-Kandidatengene

Die im Vorfeld ausgewählten Kandidatengene *NFP-like1*, *NFP-like2*, *NFP-like3* und *NFP-like4* kodieren für Lysin-Motiv-Rezeptor-ähnliche Kinasen, die im Zusammenhang mit Resistenz und Symbiose pilzlicher Organismen stehen. Es sollte überprüft werden, ob die Kandidatengene in der Pappel eine Funktion bei der Ausbildung der Symbiose mit mykorrhizierenden Pilzen innehaben. Zur Überprüfung der Expression der *NFP-like*-Kandidatengene *in silico* wurden eFP-Datenbanken verschiedener *Populus*-Arten verwendet. Anschließend wurde die Expression der Kandidatengene quantitativ in verschiedenen Geweben der zu transformierenden *P. × canescens* (P1) bestimmt.

3.2.1 *In silico*-Analyse in verschiedenen *Populus*-Arten

Die Kandidatengene *NFP-like1*, *NFP-like2*, *NFP-like3* und *NFP-like4* wurden *in silico* in verschiedenen eFP-Browsern mit unterschiedlichen *Populus*-Arten auf ihre Expression in Blatt, Sprossachse und Wurzelgewebe untersucht.

Im eFP-Browser von BAR (<http://bar.utoronto.ca/efppop/cgi-bin/efpWeb.cgi>, 18.05.2019) wurden Expressionsanalysen in *Populus balsamifera* durchgeführt (Wilkins *et al.*, 2009). Das *Online-Tool* gab unter den gewählten Einstellungen des „*Absolut*“-Modus für die Kandidatengene *NFP-like1*, *NFP-like2*, *NFP-like3* und *NFP-like4* unterschiedliche Werte in „*Level*“ für die gesuchten Gewebe an (Abbildung 3.4 A). Interessanterweise waren für *NFP-like1* keine Expressionsdaten im verwendeten eFP-Browser vorhanden. Weiterhin wurde der eFP-Browser von PopGenIE (<http://popgenie.org/eximage>, 18.05.2019) gewählt, um Expressionsdaten zu den Pappelklonen *Populus trichocarpa* und *Populus tremula* zu gewinnen. Hierzu wurde für *P. trichocarpa* die *in silico*-Analyse unter Verwendung der *P. trichocarpa* „*tissues*“ durchgeführt, für *P. tremula* wurde der *P. tremula* exAtlas genutzt. Für die Entnahme der Werte wurde der „*Absolut*“-Modus gewählt. In *P. trichocarpa* waren Expressionsdaten zu allen Kandidatengenen vorhanden (Abbildung 3.4 B), während in *P. tremula* keine Daten für *NFP-like2* vorlagen (Abbildung 3.4 C).

Die Ergebnisse zur Expression von *NFP-like2*, *NFP-like3* und *NFP-like4* in Wurzel, Sprossachse und Blättern zeigten, dass die Kandidatengene in *P. balsamifera* unterschiedlich exprimiert waren (Abbildung 3.4 A). *NFP-like2* war in allen Geweben im Vergleich zu *NFP-like3* und *NFP-like4* am schwächsten exprimiert. Die Expression von *NFP-like2* war in der Sprossachse und in jungen Blättern am höchsten. Die stärkste Expression wurde, im Vergleich zu *NFP-like2* und *NFP-like4*, für *NFP-like3* in allen Geweben verzeichnet. *NFP-*

3 Ergebnisse

like3 und *NFP-like4* waren im Gegensatz zu Blatt und Sprossachse am stärksten in Wurzeln exprimiert. *NFP-like3* hatte zudem eine starke Expression in jungem Blattgewebe.

Die Expressionsdaten der Kandidatengene in *P. trichocarpa* lagen in einem Bereich von 4,76–7,78 (Abbildung 3.4 B). *NFP-like1* hatte die höchste Expression mit 7,13 in der Sprossachse und die geringste Expression mit 5,44 in den Wurzeln. Die Expression von *NFP-like2* unterschied sich in allen betrachteten Geweben kaum. Die Werte betragen maximal 6,41 in jungen Blättern bis minimal 5,99 in Wurzelgewebe und schienen ähnlich verteilt zu sein wie die Werte für *NFP-like1*. *NFP-like3* hatte mit einem Wert von 5,72 die höchste Expression im Wurzelgewebe und lag damit deutlich unter der Expression von *NFP-like2* im gleichen Gewebe. Die höchste Expression im Wurzelgewebe zeigte das Kandidatengen *NFP-like4* mit einem Wert von 7,78.

Für *P. tremula* waren für *NFP-like2* keine Expressionsdaten vorhanden (Abbildung 3.4 C). Die Expression von *NFP-like1* war im Vergleich zu *NFP-like3* und *NFP-like4* in den betrachteten Geweben am geringsten und in Blättern nicht vorhanden. *NFP-like3* wies die stärkste Expression im Wurzelgewebe im Vergleich zu den anderen Kandidatengenen auf. Die geringste Expression von *NFP-like3* war im Blattgewebe zu finden, während die Expression in der Sprossachse zwischen der Expression im Wurzel- und Blattgewebe lag. *NFP-like4* hatte die höchste Expression im Blattgewebe, eine geringere im Wurzelgewebe und die geringste Expression in der Sprossachse.

Zusammenfassend konnte für zwei *Populus*-Arten, eines der *NFP-like*-Kandidatengene nicht nachgewiesen werden. *P. balsamifera* fehlte das Kandidatengen *NFP-like1*, in *P. tremula* war *NFP-like2* nicht vorhanden. Bemerkenswert war, dass es sich jeweils um ein Gen eines paralogen Paares handelte. In *P. trichocarpa* waren alle Kandidatengene exprimiert.

3 Ergebnisse

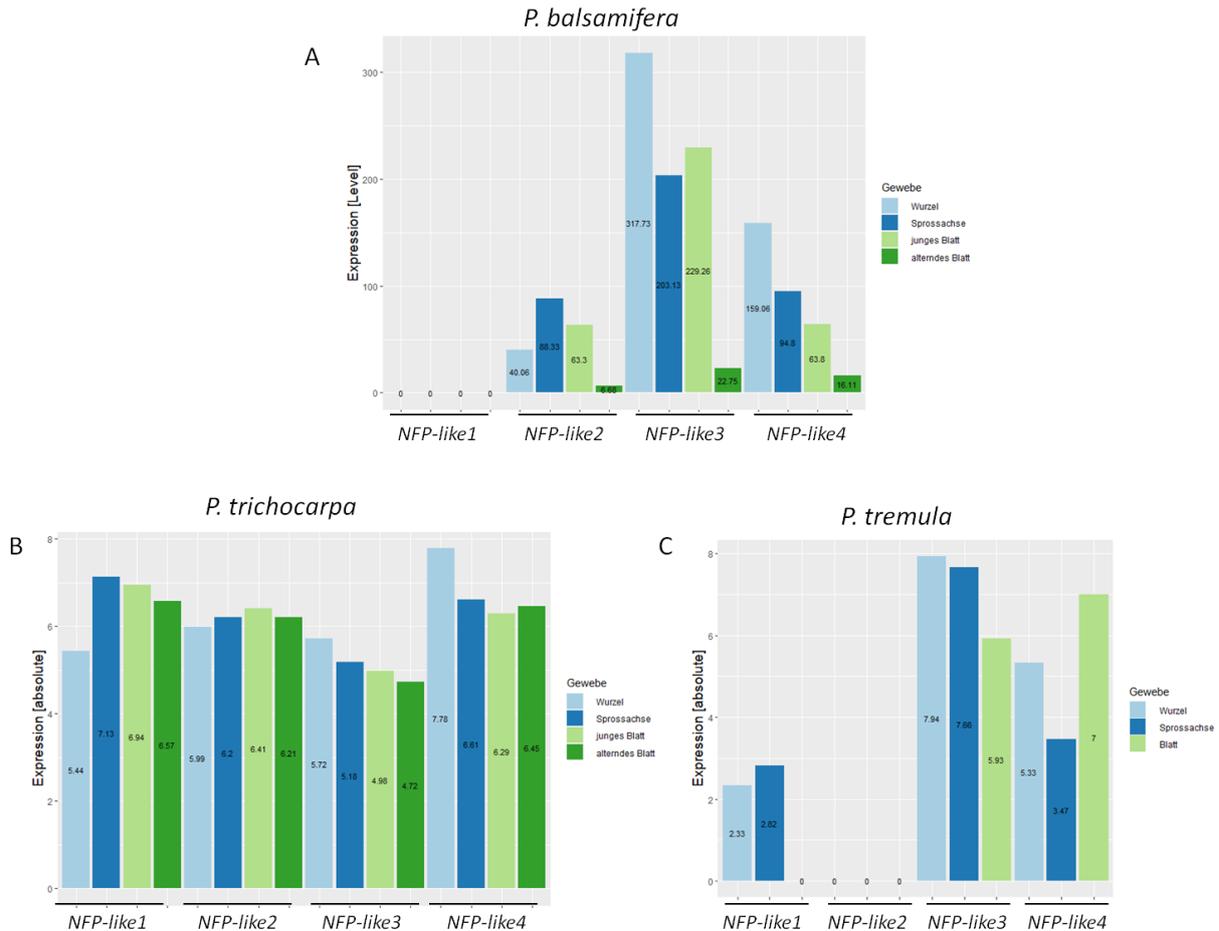


Abbildung 3.4 *In silico*-Expressionsanalyse der *NFP-like*-Kandidatengene

Expression der Kandidatengene *NFP-like1*, *NFP-like2*, *NFP-like3* und *NFP-like4* in verschiedenen *Populus*-Arten in den Geweben Wurzel, Sprossachse, jungen Blättern, alternden Blättern und in Blatt. Die Grafiken wurde unter Verwendung von RStudio und dem Paket ggPlot (Wickham, 2009) erstellt. Werte des Expressionssignals der einzelnen Gewebe sind mittig in den Säulen angegeben. A: *Populus balsamifera*, Daten entnommen von Wilkins *et al.* (2009) unter Verwendung des eFP-Browsers (<http://bar.utoronto.ca/efppop/cgi-bin/efpWeb.cgi>; 18.05.2019). B: *Populus trichocarpa*, Daten von PopGenIE (<http://popgenie.org/eximage>, 18.05.2019) entnommen. C: *Populus tremula*, Daten von PopGenIE (<http://popgenie.org/eximage>, 18.05.2019) entnommen.

3.2.2 Quantitative Analyse der Expression von *NFP-like* in *P. × canescens*

Um die vorhandene Transkriptmenge der Kandidatengene *NFP-like1*, *NFP-like3* und *NFP-like4* in verschiedenen Geweben (Blatt, Sprossachse und Wurzel) des verwendeten Pappelklons *P. × canescens* (P1) zu bestimmen, wurde die erzeugte cDNA mittels Real-Time PCR (2.10.3) analysiert.

Für die Expressionsanalysen wurden nur RNA-Proben für die cDNA-Synthese verwendet, die einen RIN-Wert von mindestens 7,0 aufwiesen. Die Expression der Kandidatengene *NFP-like1*, *NFP-like3* und *NFP-like4* sowie die Expression des Referenzgens *UBIQUITIN II* wurde mittels Real-Time PCR untersucht. In die Analyse der Transkriptmenge wurden vier

3 Ergebnisse

biologische Replikate pro verwendetes Gewebe einbezogen. Die Auswertung der durch Real-Time PCR erhobenen Daten erfolgte wie in 2.10.3 beschrieben und wurde im Anschluss mittels RStudio und unter Verwendung des Paketes ggPlot (Wickham, 2009) grafisch dargestellt (Abbildung 3.5).

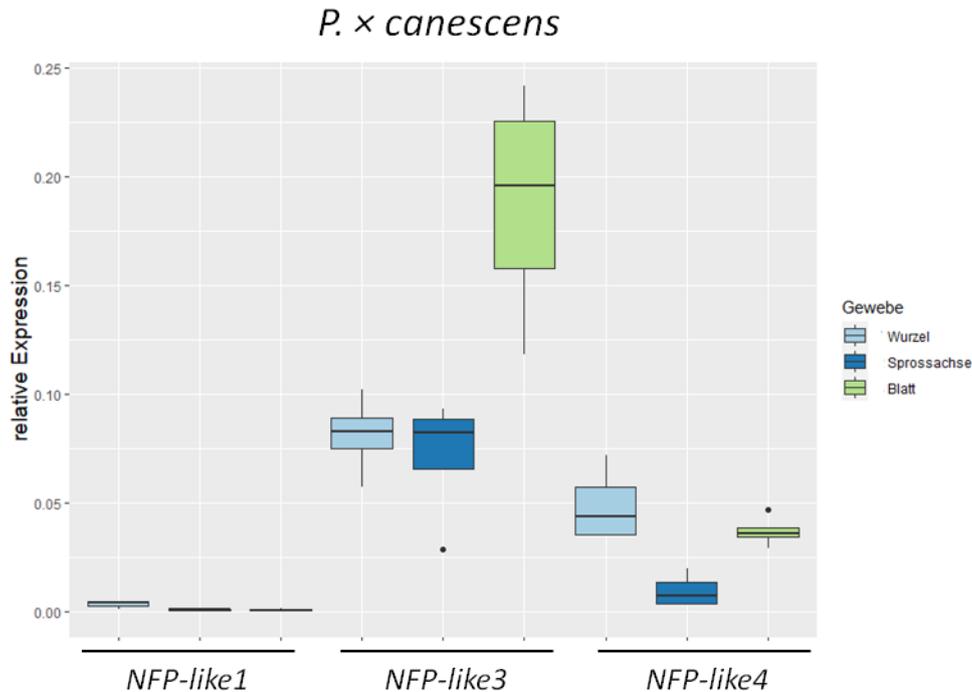


Abbildung 3.5: Relative Expression der Kandidatengene in *P. x canescens* (P1)

Boxplots nach Auswertung der durch Real-Time PCR erhobenen Daten zu den Kandidatengenen *NFP-like1*, *NFP-like3* und *NFP-like4* in Blatt-, Spross- und Wurzelgewebe in *P. x canescens* (P1). Die Daten wurden anhand der Expression des Referenzgens *UBIQUITIN II* normalisiert.

Die Abbildung 3.5 zeigt, die Expressionsdaten der Real-Time PCR-Analyse der Kandidatengene in Blatt-, Spross- und Wurzelgewebe. *NFP-like1* war im Blatt- und Sprossgewebe nicht und im Wurzelgewebe minimal über Null exprimiert ist. Die Expression von *NFP-like3* war, im Vergleich zu *NFP-like1* und *NFP-like4*, in allen analysierten Geweben am höchsten. Die stärkste Expression von *NFP-like3* wurde im Blattgewebe detektiert. *NFP-like3* war ähnlich stark in Spross- und Wurzelgewebe exprimiert, jedoch deutlich geringer als im Blattgewebe. Anhand der Expressionsdaten konnte eine Funktion, ob bei der Ausbildung einer Symbiose oder anderer Natur, von *NFP-like3* im Wurzelgewebe nicht ausgeschlossen werden. *NFP-like3* zeigte im Vergleich zu den Kandidatengenen *NFP-like1* und *NFP-like4* die stärkste Expression im Wurzelgewebe. Die Expressionswerte von *NFP-like4* lagen deutlich unter den Werten von *NFP-like3* und waren im Wurzelgewebe am höchsten.

3.3 CRISPR/Cas9-Modifikation von *NFP-like1* in *P. × canescens*

Zur funktionellen Analyse der Lysin-Motiv-Rezeptor-ähnlichen Kinasen (LysM-RLKs), die vermutlich bei der Ausbildung der Symbiose beteiligt sind, wurde die CRISPR/Cas9-Technik verwendet, um durch eine Veränderung in den zu untersuchenden Genen einen *Knockout* des Gens zu erzeugen. Durch eine Veränderung sollte die Funktionsfähigkeit des jeweiligen resultierenden Proteins gemindert oder im Idealfall die Synthese des Proteins verhindert werden. Um die Wahrscheinlichkeit einer Modifikation in den jeweiligen genomischen Sequenzen des zu untersuchenden Gens zu erhöhen, wurden Transformationsplasmide mit zwei gRNAs gewählt.

Zur Funktionsanalyse der Gene, die als paraloge Paare vorliegen, sollte nach Möglichkeit eine Modifikation in beiden paralogen Genen erzeugt werden, da das jeweilige Paralog die Funktion des anderen übernehmen kann. Über PCR wurde nach erfolgter Transformation und Regeneration der putativ transgenen Regenrate überprüft, ob die T-DNA vollständig in das Genom integriert wurde. Hierzu wurden Oligonukleotide gewählt, die den rechten Randbereich (*right border*), einen Teil der gRNA, in der T-DNA amplifizierten. Außerdem wurden Oligonukleotide erzeugt, die in der Resistenzkassette binden und somit den linken Randbereich (*left border*) der T-DNA amplifizierten. Zum Nachweis einer Modifikation in den gRNA-Targets der zu modifizierenden Kandidatengene wurden Oligonukleotide gewählt, die den jeweiligen Bereich der gRNAs amplifizierten und die erzeugten Amplikons zur Analyse in einer Sanger-Sequenzierung eingesetzt.

3.3.1 Modifikationen von *NFP-like1*

3.3.1.1 Modifikation auf genomischer Ebene

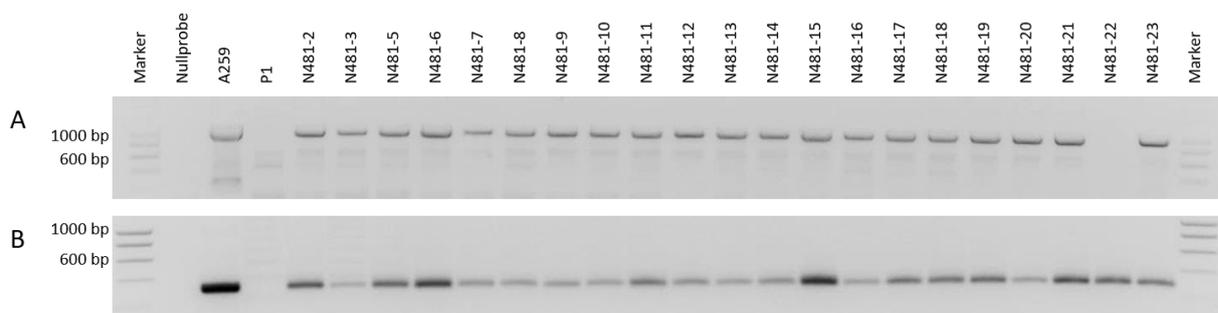
Die Transformation von *P. × canescens* (P1) mit dem Transformationsvektor A259 zur CRISPR/Cas9-induzierten Modifikation von *NFP-like1* ergab 133 regenerierende Explantate. Die analysierten Regenerate wurden mit der Nummer N481 als Transformationsnummer und einer fortlaufenden Nummer bezeichnet. Zunächst wurden über PCR die regenerierenden Explantate auf die Integration der T-DNA getestet. Hierzu wurde der Randbereich der T-DNA an der *left border* und an der *right border* amplifiziert (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Integrationsnachweis der T-DNA in das Pappelgenom nach Transformation mit dem Transformationsvektor A259

Angegeben ist die Anzahl der regenerierten Explantate, die zur Analyse der vollständig integrierten T-DNA verwendet wurden. Der Nachweis zur T-DNA-Integration erfolgte über PCR-Analysen des *hph*-Gens und gRNA als Randbereiche der T-DNA.

Anzahl Regenerate	Nachweis <i>hph</i> -Gen	Nachweis gRNA	Anzahl nach Analyse
133	130	115	111

Zum Nachweis der *left border* diente das *Hygromycin B phosphotransferase (hph)* -Gen. Die *right border* wurde über den gRNA-Bereich nachgewiesen (Abbildung 3.6). In Abbildung 3.6 ist zur Veranschaulichung lediglich ein Teil der 133 untersuchten Regenerate dargestellt. Zur Kontrolle der Amplifikation wurden der Transformationsvektor, ebenso der Kontroll-Klon P1 und eine Nullprobe ohne DNA-Matrize eingesetzt. Beispielsweise ist in der Linie N481-22 in Abbildung 3.6 A kein Amplikon für das *hph*-Gen vorhanden, jedoch für die gRNA (Abbildung 3.6 B). Alle Linien, in denen kein Amplikon für das *hph*-Gen und/oder der gRNA vorhanden war, wurden für die weiteren Analysen verworfen (Tabelle 3.1). Die Analyse der verbliebenen putativ transgenen Regenerate ergab, dass insgesamt in drei Explantaten das *hph*-Gen nicht nachgewiesen werden konnte. In 18 putativ transgenen Regeneraten konnte das Amplikon der gRNA nicht erzeugt werden, sodass die verbliebenen 111 transgenen Linien auf ihre Modifikation in *NFP-like1* analysiert wurden.

**Abbildung 3.6: PCR-Nachweis der T-DNA-Integration in Regeneraten der N481-Transformation**

PCR-Amplifikation der Randbereiche der T-DNA zum Nachweis der vollständigen Integration A: Amplikon des *hph*-Gens mit den Oligonukleotiden #2091 und #2092, erwartete Fragmentgröße 1.027 bp. B: Amplikon des gRNA-Bereiches mit den Oligonukleotiden #2419 und #2420, erwartete Fragmentgröße 227 bp. Marker: SmartLadder (Eurogentec, Belgien); A259: Transformationsvektor A259; *hph*-Gen an der *left border*; Teil der gRNA an der *right border*.

3 Ergebnisse

Der Nachweis einer möglichen Modifikation in *NFP-like1*, die durch einen mittels CRISPR/Cas9 bedingten Doppelstrangbruch und anschließender zelleigener Reparatur zustande gekommen ist, erfolgte über die Amplifikation der gRNA-Targetbereiche in *NFP-like1* und anschließender Sanger-Sequenzierung. Im Folgenden werden die entstandenen Modifikationen in *NFP-like1* für die beiden zu modifizierenden gRNA-Targetbereiche, die 1.115 bp voneinander entfernt sind, beschrieben. Zur Amplifikation des gesamten Fragmentes von gRNA1 und gRNA2 in *NFP-like1* wurden die in Tabelle 2.7 beschriebenen Oligonukleotide #2257 und #2260 verwendet (Abbildung 3.7). Die Amplifikation des gesamten Fragmentes diente dem Nachweis, ob durch den Doppelstrangbruch zwischen gRNA1 und gRNA2 die 1.115 bp vollständig oder teilweise entfernt wurden. Eine derartige Modifikation wäre durch ein kleineres Fragment direkt im Agarosegel ersichtlich gewesen. Dies konnte für keine der analysierten Linien beobachtet werden. Für einen Teil der analysierten Linien ist die PCR-Amplifikation der beiden gRNAs in Abbildung 3.7 A dargestellt.

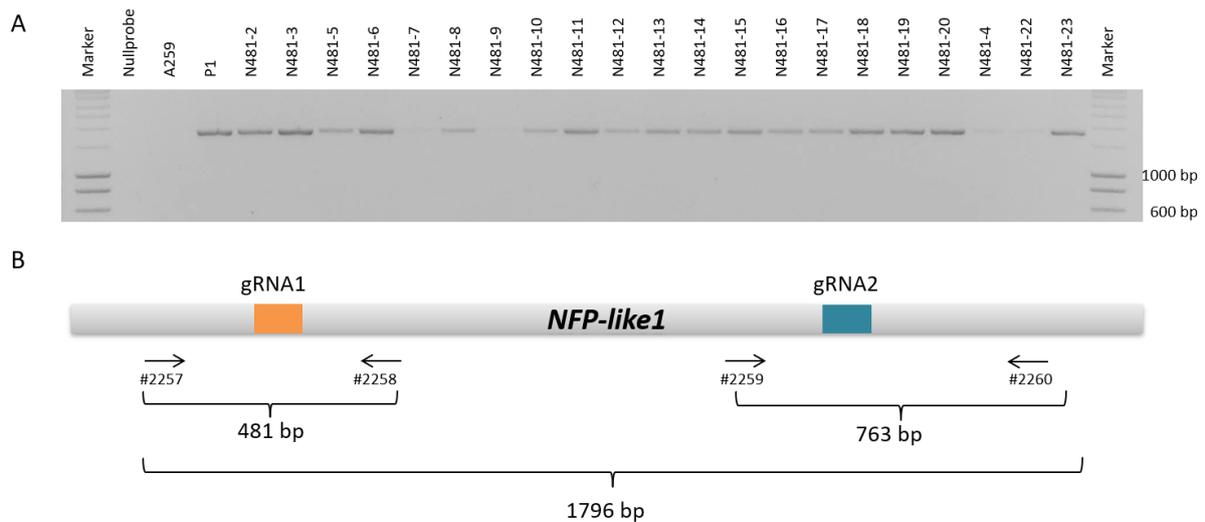


Abbildung 3.7: PCR-Amplifikation der gRNA1- und gRNA2-Targetbereiche in *NFP-like1*

A: PCR-Amplifikation der gRNA1- und gRNA2-Targetbereiche in *NFP-like1* mit den Oligonukleotiden #2257 und #2260, erwartete Fragmentgröße 1.796 bp. B: Schematische Darstellung der Oligonukleotidbindestellen in *NFP-like1* mit Angabe der zu erwartenden Fragmentgröße. A259: Transformationsvektor A259; Marker: SmartLadder (Eurogentec, Belgien); Nullprobe: ohne DNA-Matrize, bp: Basenpaare.

***NFP-like1* gRNA1-Target**

Zur Analyse einer Modifikation in *NFP-like1* wurde das mit den Oligonukleotiden #2257 und #2260 generierte Amplikon zur Sanger-Sequenzierung eingesetzt. Um die einzelnen gRNA-Targetbereiche analysieren zu können, wurden für die Targets die innen liegenden Oligonukleotide #2258 und #2259 zusätzlich zur Sanger-Sequenzierung verwendet.

Die Analyse der Chromatogramme nach erfolgter Sanger-Sequenzierung der Targetbereiche zeigte, dass bei der Amplifikation mit den verwendeten Oligonukleotiden auf dem nicht-transformierten Kontroll-Klon P1 beide Allele amplifiziert wurden. Unter den verwendeten Bedingungen konnte jedoch für die 111 analysierten Regenerate nur die Veränderung im Alba-Allel nachgewiesen werden. Beispielhaft ist dies für die Linien N481-117 und N481-118 in Abbildung 3.8 dargestellt. In dem Kontroll-Klon P1 sind zwei Nukleotide (Adenin und Thymin) an der markierten Position vorhanden, während in den transgenen Linien nur ein Nukleotid abgebildet ist. Das Adenin-Nukleotid befindet sich auf dem Tremula- und das Thymin-Nukleotid auf dem Alba-Allel. In den transgenen Linien N481-117 und N481-118 findet sich nur das Alba-spezifische Thymin-Nukleotid. Die für N481-117 und N481-118 beobachteten Modifikationen konnten daher nur für das Alba-Allel gewertet werden.

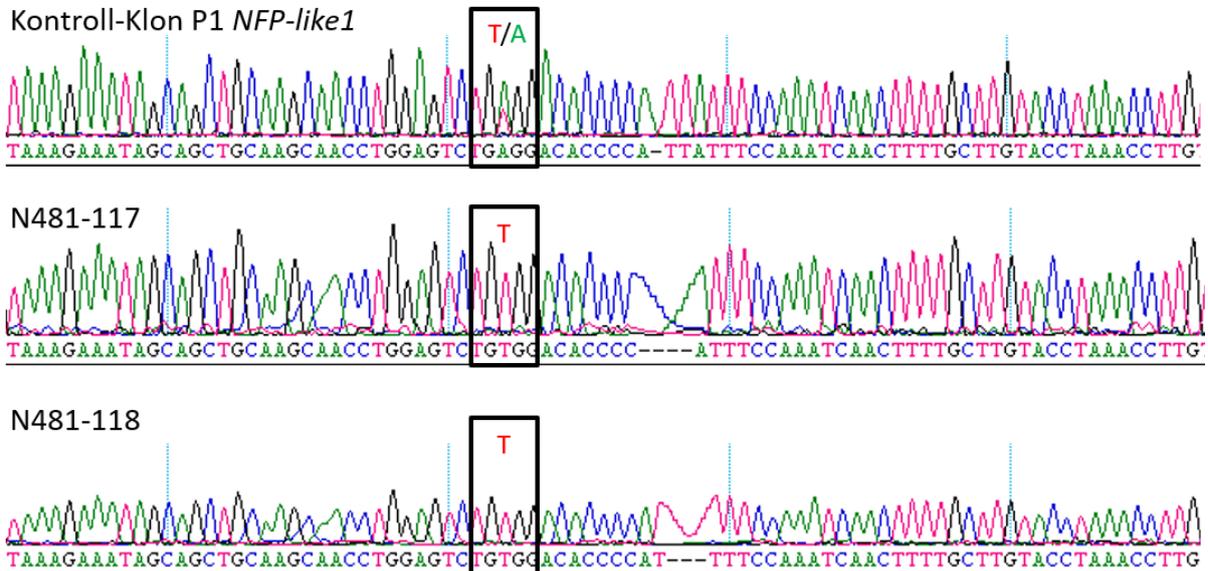


Abbildung 3.8: Chromatogramme der Sanger-Sequenzierung von gRNA1 in *NFP-like1* im Kontroll-Klon P1 und zwei ausgewählten transgenen Linien

Chromatogramme der Sanger-Sequenzierung von *NFP-like1* nach Amplifikation mit #2257 und #2260, resultierendes Chromatogramm durch das Oligonukleotid #2257 zum Nachweis der Modifikation am gRNA1-Target. Dargestellt ist der Kontroll-Klon P1 mit einem Adenin-Nukleotid für das Tremula-Allel und einem Thymin-Nukleotid für das Alba-Allel. In den modifizierten Linien N481-117 und N481-118 ist jeweils das Thymin-Nukleotid für das Alba-Allel vorhanden, jedoch nicht das Adenin-Nukleotid des Tremula-Allels. Schwarzes Rechteck: Markierung des SNPs.

3 Ergebnisse

Bei der Analyse der Oligonukleotide wurden Sequenzunterschiede zu dem Tremula- und dem Alba-Allel nachgewiesen, sodass nur das Alba-Allel über PCR amplifiziert wurde. Die Modifikation des Alba-Allels ergab 40 Einzelmodifikationen an der CRISPR/Cas9-Modifikationsschnittstelle. 51 Regenerate mussten anhand der Ergebnisse als Chimären eingestuft werden, da heterogene Sequenzen bei der Amplifikation nur eines Allels vorlagen. Bei 11 Linien konnten keine Modifikationen beobachtet werden und sie entsprachen in der Sequenzanalyse genetisch dem Kontroll-Klon P1, 9 Linien waren nicht auswertbar. Für eine der transgenen Linien konnten die Amplikons beider Allele erzeugt und die Linie als heterozygot biallelisch identifiziert werden.

Verschiedene Modifikationen konnten an der CRISPR/Cas9-Modifikationsschnittstelle detektiert werden. Die häufigste Modifikation war die Deletion eines einzelnen Adenin-Nukleotids. Fünfmal konnte die Deletion von drei Nukleotiden nachgewiesen werden, in der gleichen Häufigkeit traten Insertionen eines einzelnen Adenin-Nukleotids auf. Eine Deletion von zwei Nukleotiden wurde zweimalig beobachtet und eine Deletion von fünf Nukleotiden einmalig. Eine Insertion von 36 Nukleotiden an der Schnittstelle wurde einmalig nachgewiesen. Die Verteilung der beschriebenen Modifikationen ist in Abbildung 3.9 zusammengefasst.

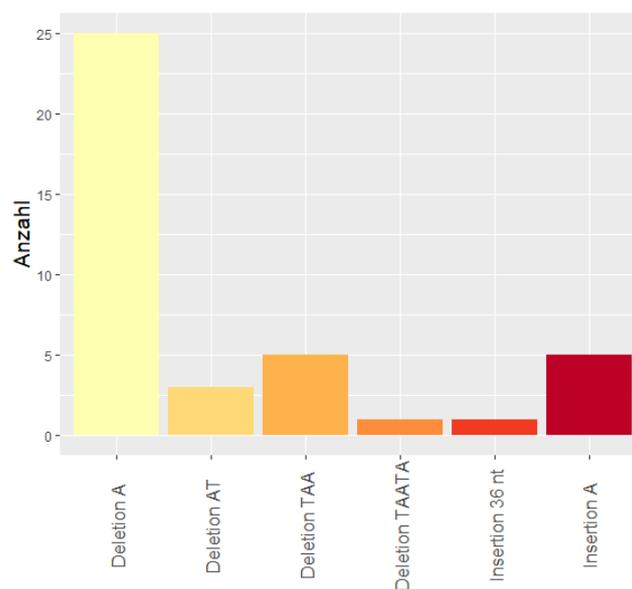


Abbildung 3.9: *NFP-like1* gRNA1-Target-Modifikationen des Alba-Allels

Dargestellt ist die Häufigkeit der auftretenden Einzelveränderungen im Alba-Allel durch CRISPR/Cas9 im gRNA1-Target von *NFP-like1*. Nt: Nukleotide; A: Adenin-Nukleotid, T: Thymin-Nukleotid.

3 Ergebnisse

Anhand der Modifikationen im Alba-Allel wurden 7 Linien mit unterschiedlichen Modifikationen für die weiteren Analysen ausgewählt. Die Analyse einer Modifikation im gRNA1-Target von *NFP-like1* im Tremula-Allel erfolgte in einer erneuten Amplifikation des gRNA-Targetbereiches mit den Tremula-spezifischen Oligonukleotiden #2723 und #2771 (Abbildung 3.10). Zum Nachweis, dass die Modifikationen identisch waren, wurden von ausgewählten Linien zwei Seitensprosse eingesetzt. In den ausgewählten Linien waren keine unterschiedlichen Modifikationen vorhanden, sodass die Linien ohne A und B bezeichnet werden. In Abbildung 3.10 ist deutlich zu erkennen, dass in der Linie N481-97 eine Insertion von mehreren Nukleotiden durch den Doppelstrangbruch erfolgt ist, da die PCR-Fragmente im Agarosegel langsamer liefen als die anderen Fragmente.

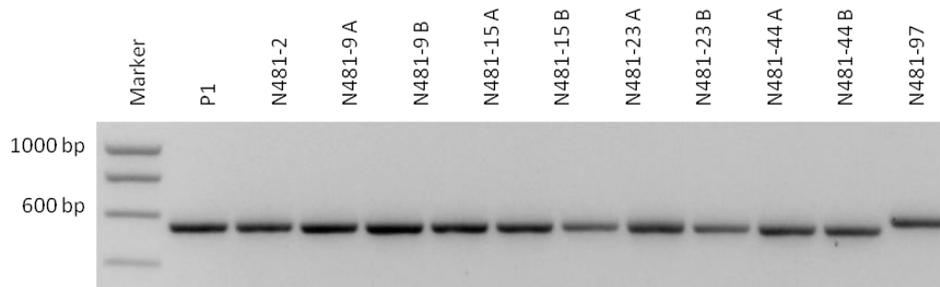


Abbildung 3.10: PCR-Amplifikation des Tremula-Allels in *NFP-like1* gRNA1-Target

PCR-Amplifikation des Tremula-Allels von *NFP-like1* gRNA1-Target in transgenen Regeneraten und dem Kontroll-Klon P1 zum Nachweis der CRISPR/Cas9-vermittelten Modifikation. Oligonukleotide #2723 und #2771, erwartete Fragmentgröße 561 bp. Marker: SmartLadder (Eurogentec, Belgien).

Die nachgewiesenen Modifikationen von *NFP-like1* im gRNA1-Target sind in Tabelle 3.2 für beide Allele angegeben. Nur in der Linie N481-2 konnte eine identische Modifikation für das Tremula- und Alba-Allel nachgewiesen werden. Die Linie N481-97 war mit einer Insertion von mehreren Nukleotiden in beiden Allelen nicht identisch. Im Tremula-Allel wurden 42 Nukleotide inseriert, die mit einem E-Wert von $E=6^{-12}$ dem mitochondrialen Genom von *Populus tremula* × *Populus alba* (NCBI Nucleotide Blast, 20.02.2020) entsprachen. Die im Alba-Allel inserierten 36 Nukleotide entsprachen mit einem E-Wert von $E=3^{-8}$ dem mitochondrialen Genom von *Populus alba* (NCBI Nucleotide Blast, 20.02.2020). Die Linie N481-23 war eine Chimäre, in ihr lagen zwei verschiedene Versionen des Tremula-Allels vor.

Tabelle 3.2: CRISPR/Cas9-vermittelte Modifikation in *NFP-like1* am gRNA1-Target transgener Linien der N481-Transformation

Angegeben ist die Nummer der jeweiligen generierten transgenen Linie sowie die Modifikation im gRNA1-Target.

Nummer	Modifikation im gRNA1-Target
N481-2	Homozygot: Deletion A
N481-9	Heterozygot biallelisch: Deletion TAATA und Deletion A
N481-15	Heterozygot biallelisch: Insertion A und Deletion A
N481-23	Chimäre: Deletion AT, Deletion A und Deletion ATAA
N481-33	Heterozygot biallelisch: Insertion A und Deletion A
N481-44	Heterozygot biallelisch: Deletion TAA und Deletion A
N481-97	Heterozygot biallelisch: Insertion 42 Nukleotide und Insertion 36 Nukleotide

***NFP-like1* gRNA2-Target**

Die Analyse der Chromatogramme nach Amplifikation des *NFP-like1*-Fragments ergab keine Modifikation im gRNA2-Target von *NFP-like1*. Von insgesamt 111 der auf dem Alba-Allel getesteten Regenerate entsprachen alle in der Sequenzanalyse genetisch dem Kontroll-Klon P1. Die Auswahl der Linien, die für die weiteren Analysen verwendet wurden, erfolgte anhand der Modifikation im gRNA1-Target von *NFP-like1*. Wie bereits für das gRNA1-Target wurden die ausgewählten Linien nochmals auf eine Veränderung im Tremula-Allel untersucht, hierzu wurden die Oligonukleotide #2677 und #2678 verwendet. Bei der Auswertung der Chromatogramme nach Sanger-Sequenzierung konnten keine Modifikationen im gRNA2-Target für das Tremula-Allel beobachtet werden. Alle ausgewählten Linien entsprachen im gRNA2-Target in der Sequenzanalyse genetisch dem Kontroll-Klon P1.

3.3.1.2 Transkriptionelle Modifikation im gRNA1-Target

Zur Erzeugung eines Proteins wird in der Zelle die genomische DNA (gDNA) in RNA transkribiert. Auf Grundlage der RNA erfolgt die Translation, die Umsetzung der genetischen Information in ein Protein. Die in 3.3.1.1 genannten Modifikationen wurden auf DNA-Ebene nachgewiesen. Zum Nachweis, dass die beobachteten Modifikationen ebenfalls auf Transkript-Ebene vorhanden sind, wurde RNA aus Blatt- und Wurzelgewebe isoliert und mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Zur Überprüfung, dass in den Proben ausschließlich RNA enthalten war, wurden zwei Nachweise mittels PCR durchgeführt (Abbildung 3.11). Es wurden Oligonukleotide gewählt, die in Exonbereichen binden und ein Intron umspannen (#2609 und #2610). Sollte DNA vorhanden gewesen sein, wäre diese über ein größeres Amplikon im Agarosegel direkt ersichtlich. Eine weitere Oligonukleotidkombination wurde verwendet, um sicherzustellen, dass die Polymerase nicht

3 Ergebnisse

bevorzugt das kleinere Fragment in den cDNA-Proben amplifiziert. Bei der Kombination von #2825 und #2819 bindet das *reverse* Oligonukleotid in einem Intronbereich und sollte auf cDNA-Ebene kein Fragment erzeugen. Es zeigte sich für alle Proben, dass das Ergebnis der Oligonukleotidkombination #2609 und #2610 mit den Oligonukleotiden #2825 und #2819 bestätigt wurde und die Proben nicht mit gDNA kontaminiert waren.

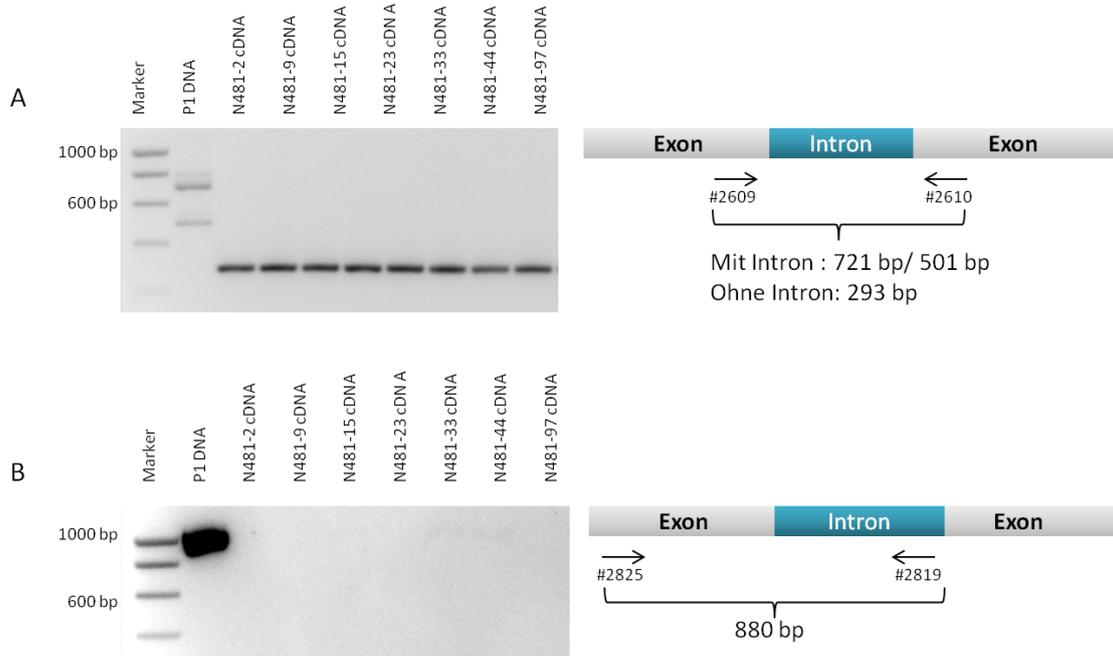


Abbildung 3.11: PCR-Überprüfung einer Kontamination von gDNA in cDNA-Proben

A: PCR-Amplifikation zum Nachweis von gDNA in cDNA-Proben über ein Intron einschließende Oligonukleotide. Die Oligonukleotide #2609 und #2610 binden zweimalig im Pappelgenom und erzeugen auf DNA-Ebene zwei Fragmente mit 721 bp und 501 bp. Ist das Intron entfernt, weisen beide Fragmente eine Größe von 293 bp auf. B: PCR-Amplifikation zum Nachweis von gDNA in cDNA-Proben über das Intron-Oligonukleotid #2819 und das Exon-Oligonukleotid #2825. Das resultierende Fragment mit 880 bp wird nur erzeugt, wenn genomische DNA in der Probe vorhanden ist. P1 DNA: P1-DNA-Matrize als Kontrolle; Marker: SmartLadder (Eurogentec, Belgien).

Ein Augenmerk wurde insbesondere auf die Modifikation im Wurzelgewebe gelegt, da die modifizierten Gene für Proteine kodieren, die an der Ausbildung der Mykorrhizierung beteiligt sein sollen. Wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben, konnte auf genomischer Ebene für das gRNA2-Target in *NFP-like1* keine Modifikation nachgewiesen werden. Daher wurde die transkriptionelle Modifikation nur im gRNA1-Target untersucht. In Abbildung 3.12 ist beispielhaft das Agarosegelbild der gRNA1-Targetregion von *NFP-like1* im Tremula-Allel unter Verwendung von cDNA aus Blatt- und Wurzelgewebe dargestellt. Für *NFP-like1* war das Gen als einzelnes Exon ohne Intron annotiert, das über die Amplifikation bestätigt werden konnte. Die Insertion von mehreren Nukleotiden in der Linie N481-97 konnte erneut direkt über das Agarosegel über ein deutlich größeres Fragment, das im

3 Ergebnisse

Agarosegel langsamer lief, bestätigt werden. Die Insertion von 42 Nukleotiden in der cDNA wurde über Sanger-Sequenzierung nachgewiesen.

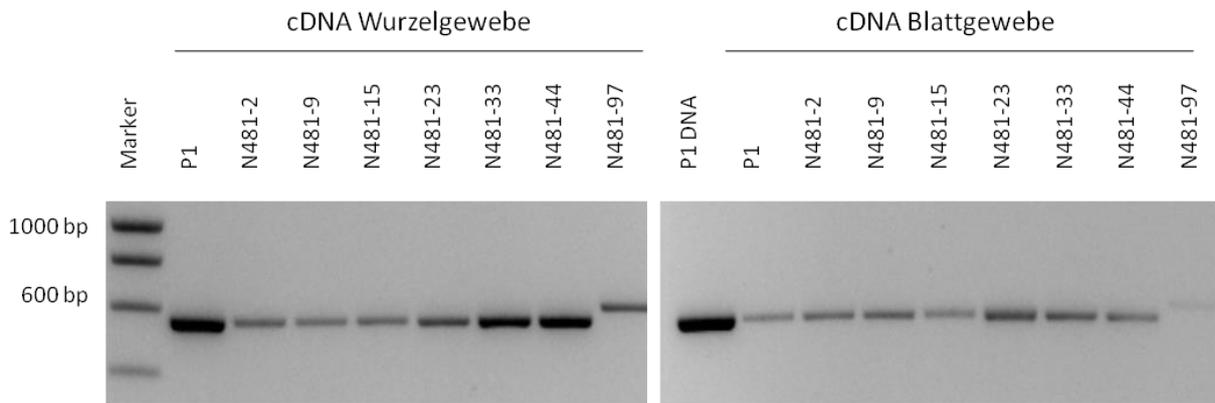


Abbildung 3.12: PCR-Amplifikation des Tremula-Allels von *NFP-like1* in verschiedenen Geweben

Die PCR-Amplifikation von *NFP-like1* gRNA1-Target mit den Tremula-spezifischen Oligonukleotiden #2723 und #2771, erwartete Fragmentgröße 561 bp. Matrize in der PCR: revers transkribierte RNA aus Wurzel- und Blattgewebe. Marker: SmartLadder (Eurogentec, Belgien).

Für die Linien N481-9, N481-33, N481-44 und N481-97 waren auf gDNA- und cDNA-Ebene identische Modifikationen zu finden (Tabelle 3.3). Modifikationsunterschiede an den gRNA-Targetbereichen zwischen den Geweben sowie zwischen gDNA und cDNA wurden für die Linien N481-2, N481-15 und N481-23 beobachtet. In der Linie N481-2 waren DNA und cDNA aus Wurzelgewebe homozygot identisch modifiziert, jedoch konnte bei der cDNA aus Blattgewebe ein chimärer Status mit zwei verschiedenen Modifikationen auf dem Alba-Allel nachgewiesen werden. Die Linie N481-15 zeigte auf gDNA-Ebene die Deletion eines Nukleotids auf dem Alba-Allel und eine Insertion eines Nukleotids auf dem Tremula-Allel. Für cDNA aus Wurzelgewebe hingegen konnte für N481-15 eine Deletion von vier Nukleotiden auf dem Alba-Allel und die Deletion eines Einzelnukleotides auf dem Tremula-Allel detektiert werden. Damit unterschied sich die Modifikation von N481-15 zwischen gDNA- und cDNA-Ebene im Wurzelgewebe. Die Linie N481-23 wies ebenfalls unterschiedliche Sequenzierungsergebnisse in den Targetbereichen auf. Die gDNA und cDNA vom Blattgewebe war identisch und als Chimäre, während cDNA vom Wurzelgewebe als heterozygot biallelisch zu werten war.

Tabelle 3.3: Modifikation von *NFP-like1* in Abhängigkeit von analysierter Nukleinsäure und Gewebe.

Gelistet sind die Modifikationen von *NFP-like1* im gRNA1-Target in den verschiedenen isolierten Nukleinsäuren A= Alba-Allel, T= Tremula-Allel, nt = Nukleotide.

Linie	Modifikation <i>NFP-like1</i> gRNA1-Target		
	gDNA	cDNA Blattgewebe	cDNA Wurzelgewebe
N481-2	<u>Homozygot</u> A: Deletion A T: Deletion A	<u>Chimäre</u> A: Deletion A, Insertion A T: Deletion A	<u>Homozygot</u> A: Deletion A T: Deletion A
N481-9	<u>Heterozygot biallelisch</u> A: Deletion TAATA T: Deletion A	<u>Heterozygot biallelisch</u> A: Deletion TAATA T: Deletion A	<u>Heterozygot biallelisch</u> A: Deletion TAATA T: Deletion A
N481-15	<u>Heterozygot biallelisch</u> A: Deletion A T: Insertion A	<u>Chimäre</u> A: Deletion A, Deletion ATAA T: Deletion A, Insertion A	<u>Heterozygot biallelisch</u> A: Deletion ATAA T: Deletion A
N481-23	<u>Chimäre</u> A: Deletion AT T: Deletion A, Deletion ATAA	<u>Chimäre</u> A: Deletion AT T: Deletion A, Deletion ATAA	<u>Heterozygot biallelisch</u> A: Deletion AT T: Deletion ATAA
N481-33	<u>Heterozygot biallelisch</u> A: Insertion A T: Deletion A	<u>Heterozygot biallelisch</u> A: Insertion A T: Deletion A	<u>Heterozygot biallelisch</u> A: Insertion A T: Deletion A
N481-44	<u>Heterozygot biallelisch</u> A: Deletion TAA T: Deletion A	<u>Heterozygot biallelisch</u> A: Deletion TAA T: Deletion A	<u>Heterozygot biallelisch</u> A: Deletion TAA T: Deletion A
N481-97	<u>Heterozygot biallelisch</u> A: Insertion 36 nt T: Insertion 42 nt	<u>Heterozygot biallelisch</u> A: Insertion 36 nt T: Insertion 42 nt	<u>Heterozygot biallelisch</u> A: Insertion 36 nt T: Insertion 42 nt

Zusammenfassend wurden in drei von sieben Linien zusätzliche Modifikationen auf cDNA-Ebene nachgewiesen. In den drei Linien konnte die zusätzliche Modifikation in cDNA aus Blattgewebe in Form eines weiteren Allels beobachtet und mussten daher als Chimäre eingestuft werden. Eine der drei Linien zeigte zusätzlich eine gänzlich andere Modifikation auf cDNA aus Wurzelgewebe.

3.3.1.3 T-DNA-Integration

Der Nachweis der in das Pappelgenom integrierten T-DNA erfolgte durch Southern-Blot-Analysen. Zunächst wurde ein Restriktionsenzym gewählt, das möglichst häufig im Pappelgenom schneidet. Der Nachweis der Integration erfolgte im Anschluss über eine spezifische Sonde. Für die aus der Transformation N481 generierten Linien wurde als spezifischer Nachweis für die *right border* eine DIG-markierte Cas9-Sonde (Abbildung 3.13 A) und als spezifischer Nachweis der *left border* eine DIG-markierte *hph*-Sonde (Abbildung 3.13 B) verwendet. In Abbildung 3.13 A ist zu erkennen, dass in der Plasmid-DNA die erwartete Größe von ca. 6.996 bp bei Verwendung der Cas9-Sonde detektiert wird (Abbildung 3.13 A). Zusätzlich zu dem erwarteten Fragment ist noch ein weiteres schwaches Fragment von ca. 3.000 bp erkennbar. Erwartungsgemäß war in der nicht-transformierten Kontrolle P1 kein Fragment für die Cas9-Sonde detektierbar. Zum Nachweis einer vollständigen Restriktion wurde eine nicht-restringierte transgene Kontrolle, die mit unv. bezeichnet wurde, verwendet. Ein schwaches Signal konnte in der nicht-restringierten Kontrolle N481-2 unv. beobachtet werden. In allen transgenen Linien wurden mindestens zwei Fragmente verschiedener Größe detektiert, sodass die T-DNA folglich mehrfach in das Pappelgenom integriert wurde. Der Nachweis mittels der *hph*-Sonde (Abbildung 3.13 B) ergab, ähnlich wie für die Cas9-Sonde, dass in allen transgenen Linien mindestens zwei Fragmente detektiert wurden. Die nicht-transformierte Kontrolle P1 zeigte für die *hph*-Sonde erwartungsgemäß kein Fragment. In der Plasmid-Kontrolle wurde das erwartete Fragment der restringierten T-DNA mit 4.403 bp detektiert. Zusätzlich zu dem erwarteten Fragment wurde noch ein kleineres, schwach ausgeprägtes Fragment in der Plasmid-Fraktion detektiert. In den restringierten transgenen Linien konnte die Mindestgröße von 2.381 bp für alle Fragmente nachgewiesen werden.

3 Ergebnisse

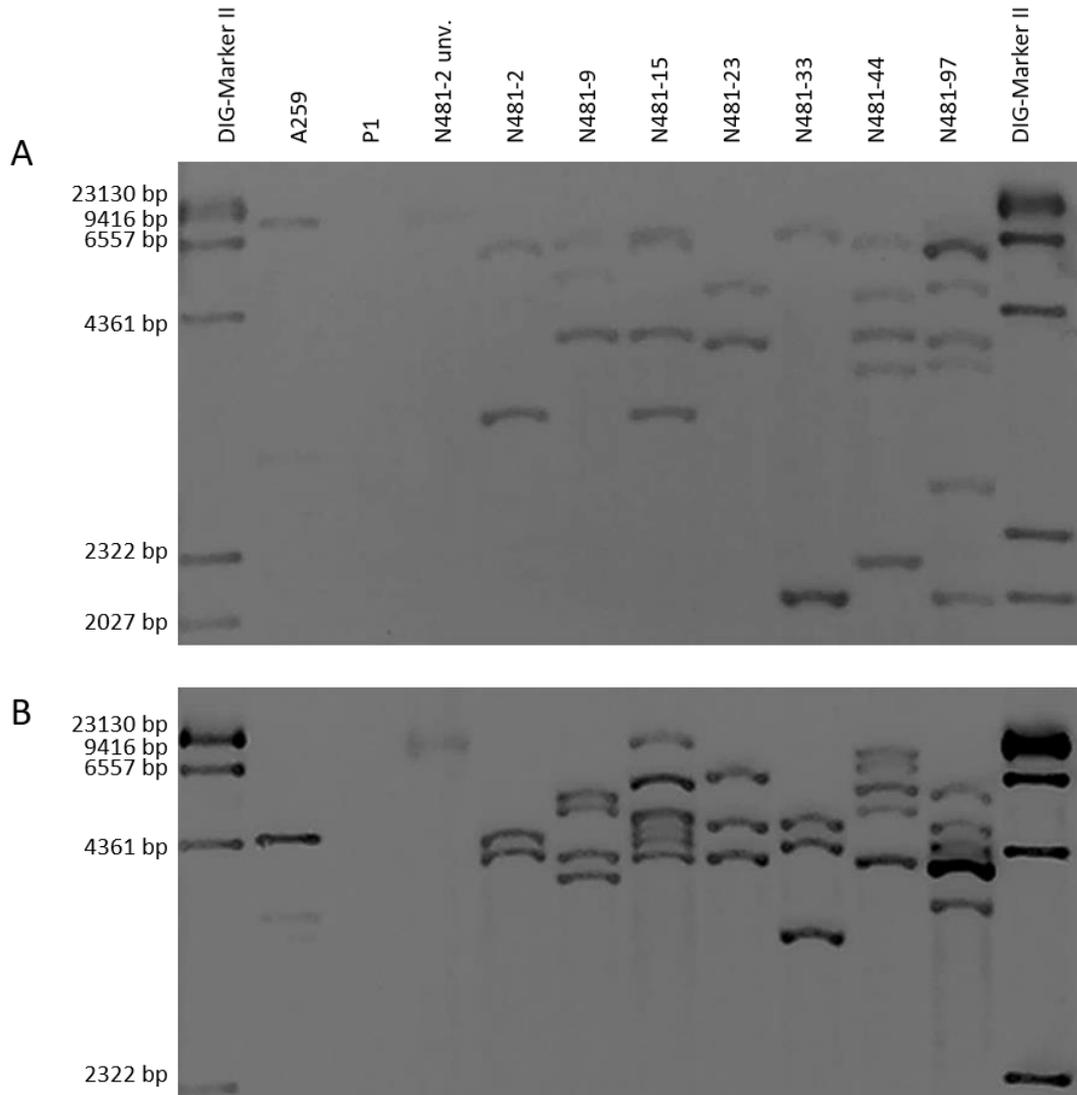


Abbildung 3.13: Southern-Blot-Detektion in *NFP-like1* transgenen Regeneraten

Detektion des Chemilumineszenz-Signals der gebundenen Cas9-Sonde an die restringierte DNA nach Zugabe von Anti-Digoxigenin und CSPD. Die Plasmid- und Pappel-DNA wurden mit *BclI* restringiert. A: Zum Nachweis der Integration wurde die Cas9-Sonde mit den Oligonukleotiden #2090 + #2540 amplifiziert und entsprach einer Größe von 676 bp. Im Plasmid wird durch Restriktion und Hybridisierung der DNA mit der Cas9-Sonde ein Fragment der Größe von 6.996 bp erwartet. Im Pappelgenom wird ein Fragment von mindestens 2.080 bp erwartet, dies entspricht der Fragmentgröße der restringierten T-DNA. B: Zum Nachweis der Integration wurde das *hph*-Gen mit den Oligonukleotiden #2571 + #2560 amplifiziert und entsprach einer Größe von 454 bp. Im Plasmid wird durch die Restriktion und der *hph*-Sonde ein Fragment der Größe von 4.403 bp erwartet. Im Pappelgenom wird ein Fragment von mindestens 2.381 bp, dies entspricht der Fragmentgröße der restringierten T-DNA, erwartet. A259: Transformationsvektor A259; P1: Pappelklon INRA 717-1B4, *P. × canescens* DNA; unv.: nicht-restringierte Kontrolle. DIG-Marker II: DNA Molecular Weight Marker II (Roche, Schweiz).

Die anhand der in den Southern-Blot-Analysen detektierten Fragmente unter Verwendung der Cas9- und *hph*-Sonde und die daraus abgeleitete Anzahl der Integrationen in den regenerierten Linien der N481-Transformation sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Tabelle 3.4: T-DNA-Integrationen in das Pappelgenom der N481-Transformanten

Anzahl an Integrationen, detektiert anhand spezifischer Sonden, die an Nukleinsäuren der T-DNA des A259 Vektors binden. Der Nachweis erfolgte mittels Restriktion und Southern-Blot-Analysen. Die verwendeten Sonden binden spezifisch in der Cas9-Sequenz und in dem *hph*-Gen des Transformationsvektors A259.

Linie	Kopienzahl Cas9-Sonde	Kopienzahl <i>hph</i> -Sonde
N481-2	2	2
N481-9	3	4
N481-15	4	6
N481-23	2	3
N481-33	2	3
N481-44	5	5
N481-97	6	5

Die Kopienanzahl unterschied sich in einigen transgenen Linien beim Vergleich der verwendeten Sonden. In N481-9 wurden vier Fragmente unter Verwendung der *hph*-Gen-spezifischen Sonde detektiert, bei Hybridisierung mit der Cas9-spezifischen Sonde nur drei Fragmente. Ähnliche Ergebnisse waren für N481-15, N481-23, N481-33 und N481-97 nachgewiesen worden. Die T-DNA war in allen Linien mehrmalig in das Genom integriert. Für die Linie N481-44 wurde mit beiden Sonden die identische Anzahl an Integrationen nachgewiesen.

3.3.2 Doppelmodifikation von *NFP-like3* und *NFP-like4*

Die Transformation von *P. × canescens* (P1) mit dem Transformationsvektor A260 zur CRISPR/Cas9-induzierten Modifikation der paralogen Gene *NFP-like3* und *NFP-like4* ergab 48 regenerierende Explantate. Die Transformation wurde N482 genannt und alle Explantate fortlaufend nummeriert. Über PCR-Amplifikation der T-DNA-Randbereiche sollte die vollständige Integration in das Pappelgenom bestätigt werden. Der rechte Randbereich (*right border*) wurde über die Amplifikation der *Neomycin Phosphotransferase* (*nptII*-Gen), der linke Randbereich (*left border*) über die gRNA in der T-DNA nachgewiesen (Abbildung 3.14). Es zeigte sich, dass 26 der putativ transgenen Regenerate, negativ auf den Bereich der gRNA waren. In den verbliebenen 26 Linien konnte der Nachweis des *nptII*-Gens lediglich für eine Linie nicht erbracht werden.

3 Ergebnisse

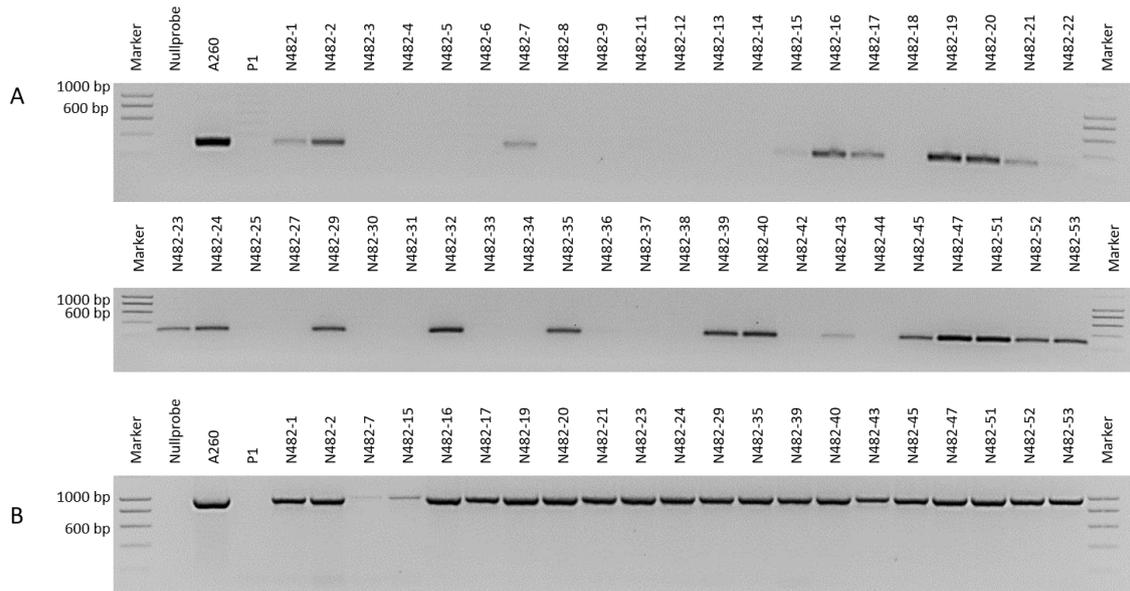


Abbildung 3.14: PCR-Nachweis der T-DNA-Integration in Regeneraten der N482-Transformation

PCR-Amplifikation zum Nachweis der vollständigen Integration der T-DNA in die putativ transgenen Linien der N482-Transformation A: Amplikon des gRNA-Bereiches mit den Oligonukleotiden #2419 und #2420, erwartete Fragmentgröße: 227 bp. B: Amplikon des *nptII*-Gens mit den Oligonukleotiden #317 und #318, erwartetes Fragment mit 965 bp. Marker: SmartLadder (Eurogentec, Belgien); A260: Transformationsvektor A260; *nptII*-Gen an der *left border*; gRNA-Bereich an der *right border*.

Aus weiteren Transformationen mit dem Transformationsvektor A260 resultierten die Transformationen mit den Nummern N489, N494 und N504, die ebenfalls auf gRNA und Resistenzkassette getestet wurden (Tabelle 3.5). Die Regeneration auf kanamycinhaltigen Medium erbrachte eine Vielzahl an Regeneraten, in denen das *nptII*-Gen durch PCR-Analysen nicht nachgewiesen werden konnte. Mit 17 nicht-transgenen Regeneraten von 20 regenerierten Explantaten waren in der Transformation N494 ebenfalls viele Explantate auf kanamycinhaltigen Medium gewachsen, in denen die T-DNA nicht ins Genom integriert war. Im Folgenden werden die Ergebnisse für die Modifikation für *NFP-like3* und *NFP-like4* dargestellt.

Tabelle 3.5: Integrationsnachweis der T-DNA in das Pappelgenom nach Transformation mit dem Transformationsvektor A260

Angegeben ist die Anzahl der regenerierten Explantate, die zur Analyse der vollständig integrierten T-DNA verwendet wurden. Der Nachweis zur T-DNA-Integration erfolgte über PCR-Analysen des *nptII*-Gens und gRNA, als Randbereiche der T-DNA.

Transformation	Anzahl Regenerate	Nachweis gRNA	Nachweis <i>nptII</i> -Gen	Anzahl nach Analyse
N482	48	23	21	21
N489	6	1	1	1
N494	20	4	3	3
N504	13	1	9	1

3.3.2.1 Genomische Modifikation von *NFP-like3*

Die Analyse der durch CRISPR/Cas9 erzeugten Modifikation von *NFP-like3* in den gewonnenen Regeneraten wird im Folgenden beschrieben. Die aus der Transformation N482 hervorgegangenen 21 Regenerate wurden mit Oligonukleotiden #2267 und #2268 getestet, die spezifisch das Alba-Allel amplifizierten (Abbildung 3.15). Mit Ausnahme der Linie N482-47 konnte in allen Linien das erwartete Fragment von 810 bp nachgewiesen werden. Abbildung 3.15 zeigt, dass das resultierende Fragment der Linie N482-47 deutlich über den nicht-transformierten Kontroll-Klon P1 liegt und deutet auf eine größere Insertion hin. Das Tremula-Allel wurde für diese Analyse nicht mit einbezogen. Linien, die keine Modifikation im Alba-Allel aufwiesen, wurden für die weiteren Analysen entfernt, sodass nur ausgewählte Linien auf eine Modifikation in beiden Allelen untersucht wurden.

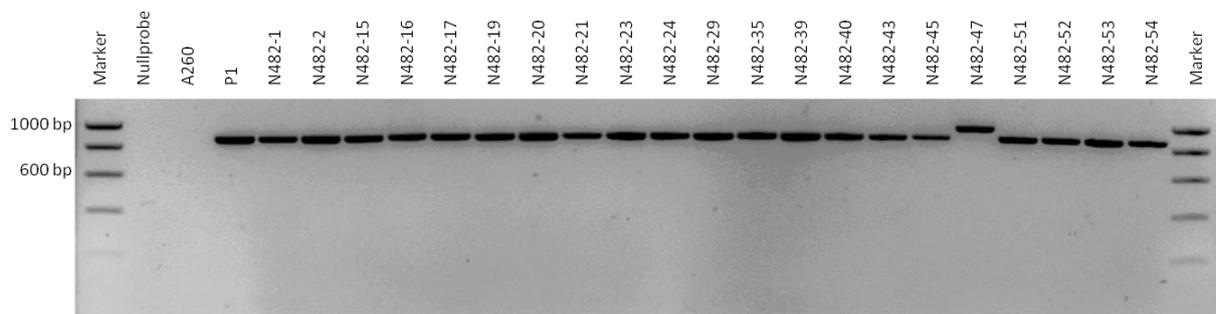


Abbildung 3.15: PCR-Amplifikation des Alba-Alles von *NFP-like3*

PCR-Amplifikation von *NFP-like3* mit den Oligonukleotiden #2267 und #2268, erwartete Fragmentgröße: 810 bp. Nullprobe: ohne DNA-Matrize; A260: Transformationsvektor A260; Marker: SmartLadder (Eurogentec, Belgien).

Die Verteilung der Modifikation für das Alba-Allel aus der Transformation N482 findet sich in Tabelle 3.6. Die Analyse der Chromatogramme zeigte für einige Linien, dass das Alba-Allel zweimalig modifiziert war. Die Regenerate waren dementsprechend nicht heterozygot, sondern als Chimäre zu werten.

Tabelle 3.6: Modifikationen in *NFP-like3* mit Alba-Allel spezifischen Oligonukleotiden

Einz: Einzelmodifikation des Alba-Allels, Chi: Chimäre mit drei Kurven im Chromatogramm, Wt: nicht modifiziert und in der Sequenzanalyse genetisch dem Kontroll-Klon entsprechend. Ges: Gesamtanzahl untersuchter Regenerate.

Nummer	Modifikation gRNA3-Target				Modifikation gRNA4-Target			
	Einz	Chi	Wt	Ges	Einz	Chi	Wt	Ges
N482	3	7	11	21	1	0	20	21

3 Ergebnisse

Insgesamt waren 52 % der analysierten Linien im gRNA3-Target nicht modifiziert und entsprachen in der Sequenzanalyse genetisch dem Kontroll-Klon P1. Im gRNA4-Target waren 95 % der Linien in der Sequenzanalyse genetisch dem Kontroll-Klon P1 entsprechend. Für 14 % der Linien wurde eine Einzelmodifikation des Alba-Allels im gRNA3-Target nachgewiesen. Besonders hervorzuheben ist die Linie N482-47 die eine Insertion von 88 Nukleotiden an der Position des Doppelstrangbruches im gRNA3-Target aufwies. Heterogene Chromatogramme, die auf Grund der Amplifikation des Alba-Allels als Chimäre zu werten waren, wurden bei 33 % der Linien im gRNA3-Target beobachtet. Die heterozygot anmutenden Chromatogramme wiesen eine Insertion eines Adenin-Einzelnukleotides auf. Im gRNA4-Target war lediglich eine Linie durch eine Insertion modifiziert.

Eine Amplifikation von *NFP-like3* erfolgte erneut mit Oligonukleotiden, die sowohl im Alba- als auch im Tremula-Allel binden. Die Amplifikation erfolgte mit den Oligonukleotiden #2267 und #2330 und ist in Abbildung 3.16 für acht ausgewählte Linien dargestellt. In allen Linien konnte ein Fragment mit der Größe von 476 bp erzeugt werden. Hervorzuheben ist die Linie N482-47, die nach der Amplifikation der beiden Allele mit den spezifischen Oligonukleotiden drei Amplifikate erzeugte. Zwei der erzeugten Amplikons waren deutlich größer als das erwartete Fragment. Die Amplifikation des Alba-Allels ergab für die Linie N482-47 ein einzelnes größeres Fragment.

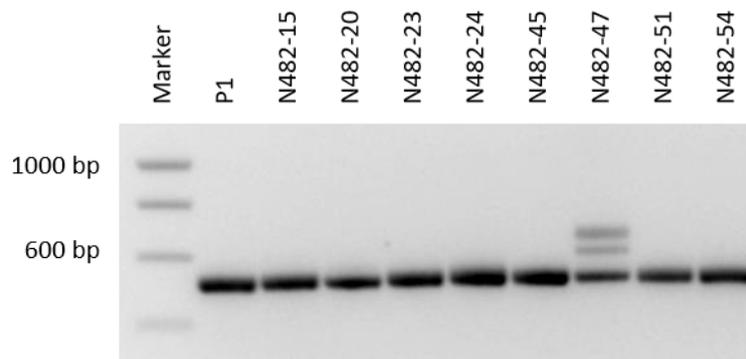


Abbildung 3.16: PCR-Amplifikation von *NFP-like3* mit Tremula- und Alba-Allel amplifizierenden Oligonukleotiden

PCR Amplifikation von *NFP-like3* mit den Oligonukleotiden #2267 und #2330, die sowohl das Alba-Allel als auch das Tremula-Allel erzeugen, erwartete Fragmentgröße: 476 bp. Marker: SmartLadder (Eurogentec, Belgien).

In Tabelle 3.7 sind die ausgewählten Linien sowie die Modifikationen in beiden Allelen zusammenfassend dargestellt. Die Ergebnisse der Modifikation im Tremula- und Alba-Allel ergab, dass für die Linie N482-20 nur das Alba-Allel, das die Insertion eines Adenin-Nukleotids im gRNA3-Target aufwies, amplifiziert werden konnte. Zu einer möglichen

3 Ergebnisse

Modifikation im gRNA3-Target des Tremula-Alles von N482-20 konnte keine Aussage getroffen werden. Drei Linien waren heterozygot monoallelisch und daher für die weiteren Analysen nicht verwendbar, ebenso die zwei Linien, die in der Sequenzanalyse genetisch dem Kontroll-Klon P1 entsprachen und keine Modifikation zeigten. Im gRNA4-Target konnten weniger Modifikationen beobachtet werden, lediglich die Linie N482-24 wies eine heterozygot monoallelische Veränderung auf. Da eines der Allele funktionsfähig war, konnte in den heterozygot monoallelischen Linien höchstens von einer Reduktion des funktionalen Proteins ausgegangen werden. Für weitere Analysen waren dementsprechend die Linien N482-24 und N482-47 von Interesse, sofern eine Modifikation in *NFP-like4* vorlag.

Tabelle 3.7: CRISPR/Cas9-vermittelte Modifikation von *NFP-like3* am gRNA3- und gRNA4-Target transgener Linien der N482-Transformation

Modifikationen von *NFP-like3* in den doppelt modifizierten Linien nach Amplifikation mit Oligonukleotiden, die das Tremula- und Alba-Allel erzeugen. Angegeben ist die Nummer der jeweiligen generierten transgenen Linie sowie die Modifikation im gRNA3- und gRNA4-Target. Wildtyp: in der Sequenzanalyse genetisch identisch zum Kontroll-Klon P1.

Nummer	Modifikation gRNA3-Target	Modifikation gRNA4-Target	Allel
N482-15	Heterozygot monoallelisch Insertion T	Wildtyp	Tremula und Alba
N482-20	Insertion A	Wildtyp	Alba
N482-23	Wildtyp	Wildtyp	Tremula und Alba
N482-24	Heterozygot monoallelisch Insertion T	Heterozygot monoallelisch Insertion A	Tremula und Alba
N482-45	Wildtyp	Wildtyp	Tremula und Alba
N482-47	Sonderfall drei Amplikons	Sonderfall drei Amplikons	Tremula und Alba
N482-51	Wildtyp	Wildtyp	Tremula und Alba

Aus den Transformationen N489, N494 sowie N504 konnten lediglich sechs Linien gewonnen werden, in denen nachweislich die gesamte T-DNA integriert war. Die einzige zu analysierende Linie aus der Transformation N489 zeigte, ähnlich wie die Linie N482-47, drei Amplikons nach der PCR-Amplifikation. Aus der Transformation N494 resultierten vier Linien, von denen ebenfalls eine Linie nach PCR-Amplifikation der gRNA-Bereiche drei Amplikons aufwies. Alle Linien, die nach PCR-Amplifikation drei Amplikons zeigten, sind in nachstehender Tabelle 3.8 nicht gelistet. Die aus den Transformationen N489, N494 und N504 resultierenden Linien wurden nicht für weitere Analysen verwendet.

Tabelle 3.8: Modifikation in *NFP-like3* in N494- und N504-Transformanten

Amplifikation von *NFP-like3* mit den Oligonukleotiden #2267 und #2330, die das Tremula- und Alba-Allel amplifizieren. Hom: Homozygot, Het mo: Heterozygot monoallelisch, Het bi: Heterozygot biallelisch; Chi: Chimäre; Wt: in der Sequenzanalyse genetisch identisch zum Kontroll-Klon P1; Ges: Gesamtanzahl untersuchter Regenerate.

Nummer	Modifikation gRNA3-Target						Modifikation gRNA4-Target					
	Hom	Het mo	Het bi	Chi	Wt	Ges	Hom	Het mo	Het bi	Chi	Wt	Ges
N494	1	1		1		3			1	1	1	3
N504				1		1				1		1

Analyse der Modifikation von *NFP-like3* in N482-47

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, konnte nach erfolgter CRISPR/Cas9-Modifikation von *NFP-like3* in der Linie N482-47 nicht ein Einzelamplikon über PCR amplifiziert werden, sondern drei Amplikons in verschiedenen Größen (Abbildung 3.17 A). Das kleinste Amplikon entsprach der erwarteten Größe von 476 bp. Zur Analyse der verschiedenen Amplikons wurden diese vereinzelt und zur Sanger-Sequenzierung eingesetzt. Das kleine Amplikon (N482-47 K) entsprach dem Tremula-Allel und wies eine Insertion von einem Einzelnukleotid im gRNA3-Target und einer weiteren Insertion im gRNA4-Target auf. Die zwei weiteren Amplikons zeigten stark überlagerte Sequenzen, sodass eine erneute PCR mit innen liegenden Oligonukleotiden durchgeführt wurde. Auf Grund der starken Ähnlichkeit beider Allele, konnte nur eines der beiden Oligonukleotide spezifisch für das zu amplifizierende Allel erzeugt werden. Das Amplikon des Zielfragments auf dem Alba-Allel ist in Abbildung 3.17 B dargestellt. Für das große Amplikon N482-47 G sowie das mittlere Amplikon N482-47 M konnten wiederum zwei Amplikons erzeugt werden. Das kleine Amplikon aus beiden wiederholten Amplifikationen von N482-47 G und N482-47 M wies eine Insertion von 88 Nukleotiden im gRNA3-Target auf. Im gRNA4-Target konnte keine Modifikation nachgewiesen werden. *Blast*-Analysen in NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ergaben, dass die 88 inserierten Nukleotide mit einem E-Wert von 8×10^{-37} mitochondrialer DNA entsprachen. Für die Amplifikation von N482-47 G konnte für das größere der beiden Amplikons die identische Modifikation mit einer Insertion von 88 Nukleotiden im gRNA3-Target und keine Modifikation im gRNA4-Target nachgewiesen werden. Das größere Amplikon war noch ca. 50 Nukleotide größer als das mittlere Amplikon mit identischer Modifikation. Ähnliches wurde für das große Amplikon von N482-47 M beobachtet, jedoch war neben der Insertion von 88 Nukleotiden im gRNA3-Target noch eine heterozygot monoallelische Modifikation im gRNA4-Target vorhanden.

3 Ergebnisse

Das resultierende Amplikon für N482-47 K entsprach dem erwarteten Amplikon von 323 bp. Im gRNA3-Target sowie im gRNA4-Target wurde je ein Einzelnukleotid inseriert. In Abbildung 3.17 C ist die Amplifikation des Tremula-Allels dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich durch erneute Amplifikation von N482-47 G, N482-47 M und N482-47 K ein Amplikon in seiner Intensität hervorhebt. Das Amplikon entsprach mit 323 bp den Erwartungen und war als einziges Amplikon in dem Kontroll-Klon P1 zu finden. Die Sequenzanalyse ergab, dass es sich um das Tremula-Allel mit je einer Einzelnukleotid-Insertion im gRNA3-Target und gRNA4-Target handelte. Bei der Amplifikation von N482-47 M, wurden zusätzlich zu dem sich deutlich hervorhebenden Amplikon noch schwächere, größere Amplikons erzeugt. Die schwachen Amplikons gaben in der Sequenzanalyse sich überlagernde Chromatogramme wieder, in denen die Modifikation des Tremula-Allels und die Modifikation des Alba-Allels zu finden war.

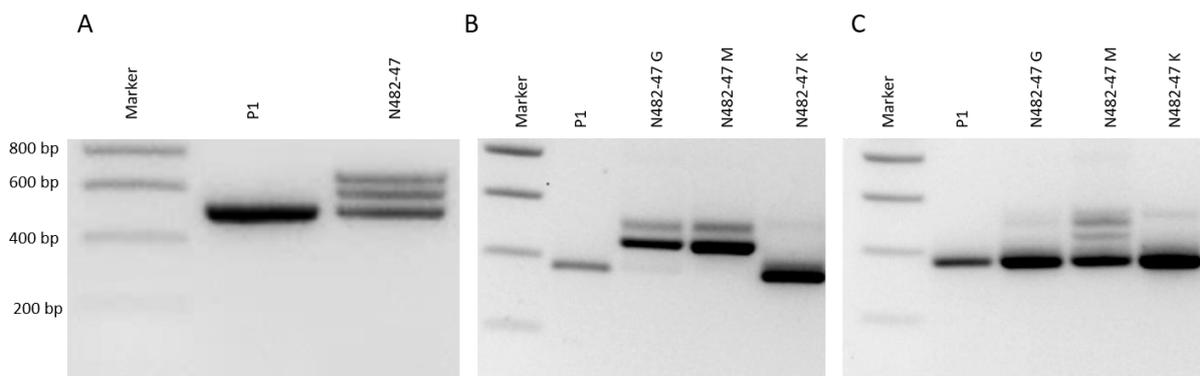


Abbildung 3.17: PCR-Amplifikation von *NFP-like3* in N482-47

PCR-Amplifikation von *NFP-like3* in dem nicht-transformierten Kontroll-Klon P1 und der transgenen Linie N482-47. Bei der Amplifikation von N482-47 wurden drei Fragmente unterschiedlicher Größe erzeugt, G: großes Fragment; M: mittleres Fragment; K: kleines Fragment; entsprechend ihrer Laufweite im Agarosegel. A: Amplifikation beider Allele mit den Oligonukleotiden #2267 und #2330, erwartete Fragmentgröße: 476 bp. B: Amplifikation der einzelnen Amplikons von N482-47 aus A mit den Oligonukleotiden #2267 und #2725. Das erwartete Amplikon des Alba-Allels beträgt 323 bp. C: Amplifikation der ausgeschnittenen Fragmente von N482-47 aus A mit den Oligonukleotiden #2267 und #2726. Das erwartete Amplikon des Tremula-Allels beträgt 323 bp. Marker: SmartLadder (Eurogentec, Belgien).

Struktur von *NFP-like3* in verschiedenen Pappelarten

Im Vorfeld der CRISPR/Cas9-Modifikationsanalyse wurde überprüft, ob die zu modifizierenden gRNA-Bereiche über PCR nachweisbar sind. In Abbildung 2.1 ist die genomische Struktur der *NFP-like*-Gene in *P. trichocarpa* angegeben. Bei der *in silico*-Analyse von *NFP-like3* zeigte sich für *P. × canescens* (P1) und *P. trichocarpa*, dass die gewählten gRNA3- und gRNA4-Targets im ersten Intron und im zweiten Exon vorhanden sind. Dementsprechend wurde versucht die Modifikationen im Exon- und Intronbereich zu

3 Ergebnisse

bestimmen. Zur Amplifikation des Intronbereiches mit den beiden gRNAs in *P. × canescens* wurden verschiedene Oligonukleotidkombinationen getestet (Abbildung 3.18). Es wurden die Oligonukleotide #2265 und #2266, #2319 und #2320, #2265 und #2330, #2319 und #2330, #2319 und #2266 sowie alle weiteren Kombinationsmöglichkeiten verwendet. Das gewünschte Fragment konnte in PCR-Amplifikationen unter Verwendung aller genannter Oligonukleotidkombinationen nicht erzeugt werden. Die *in silico*-Analyse zeigte weiterhin, dass der Bereich des ersten Introns nahezu identisch zum zweiten Exon der annotierten Genstruktur war. In *P. tremula* entsprach der intergenische Bereich vor dem Exon, dem Exonbereich. Zur Analyse, ob das erste Intron bzw. der intergenische Bereich vorhanden ist, wurden Oligonukleotide erzeugt, die intergenisch und in den Intronbereichen binden.

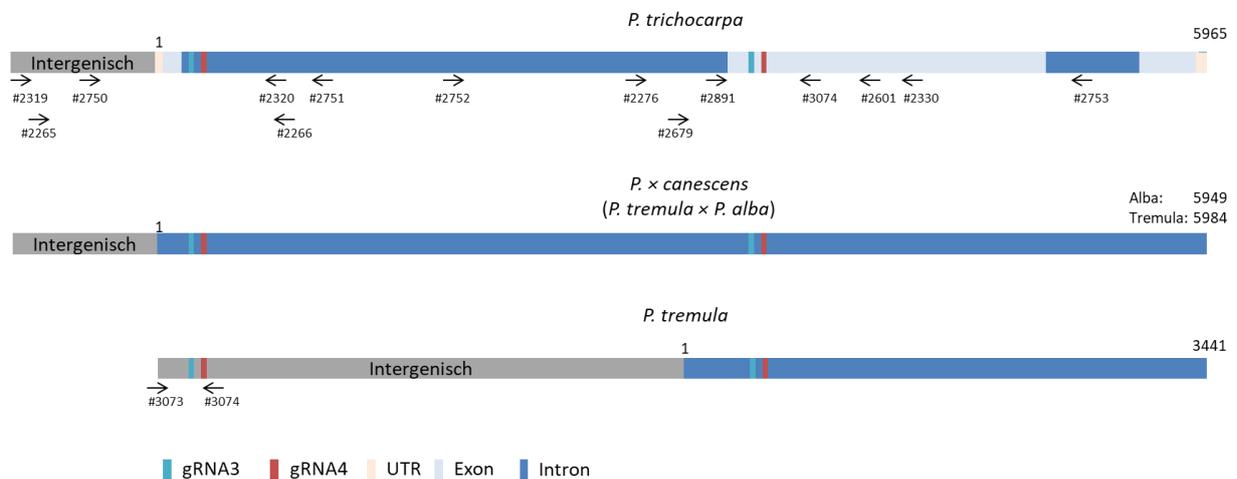


Abbildung 3.18: Struktur von *NFP-like3* in drei verschiedenen Pappelarten

Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus von *NFP-like3* in *P. trichocarpa*, *P. × canescens* (P1) und *P. tremula*. Die Daten für *P. trichocarpa* wurden der Datenbank Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!gene?search=1&detail=1&method=3252&searchText=transcriptid:27038657>; 08.05.2020), die Daten für *P. tremula* und *P. alba* der Tsai AspenDB (<http://aspen-db.uga.edu/9-uncategorised/136-gene-model-search-new-test>; 08.05.2020) und die Daten für *P. tremula* der Datenbank PopGenIE (http://popgenie.org/gene?id=Potra001009g08398&feature_id=799841&redirected=gbrowse; 08.05.2020) entnommen. Angegeben ist schematisch die Position der gRNA3 und gRNA4 sowie für *P. trichocarpa* die Exons, Introns und UTRs. Die verwendeten Oligonukleotide sind schematisch als Pfeile unter der Struktur von *NFP-like3* von *P. trichocarpa* angegeben. Die gewählten Oligonukleotide wurden an die Sequenz von P1 angepasst. Die Oligonukleotide #3073 und #3074 wurden speziell für den intergenischen Bereich von *P. tremula* erstellt und sind daher explizit dort angegeben. UTR: nicht translatierte Region (*untranslated region*).

Die Oligonukleotide #2750 und #2751 wurden gewählt, um einen Teilbereich des ersten Introns zu amplifizieren, die Oligonukleotide #2752 und #2753 für den Bereich des ersten Introns über das zweite Exon und einen Teil des zweiten Introns. Zum Vergleich der Amplikons wurde jeweils ein Klon von *P. alba* (P2), *P. tremula* (6K3) und *P. trichocarpa*

3 Ergebnisse

(Nisqually) in die PCR-Analysen einbezogen (Abbildung 3.19). Für das Amplikon des ersten Introns wurde ein Fragment mit einer Größe von 1.445 bp erwartet, dieses konnte nur in Nisqually (*P. trichocarpa*) erzeugt werden. Kein Amplikon konnte für P1 (*P. × canescens*), P2 (*P. alba*) und 6K3 (*P. tremula*) nachgewiesen werden. Die PCR-Amplifikation mit den Oligonukleotiden #2752 und #2753 sollte ein Amplikon von 2.369 bp generieren, das wiederum nur in Nisqually (*P. trichocarpa*) detektierbar war. In 6K3 (*P. tremula*) wurde ein deutlich kleineres Fragment mit ca. 1.200 bp erzeugt, wohingegen in P1 (*P. × canescens*) und P2 (*P. alba*) lediglich einige unspezifische Banden detektiert wurden.

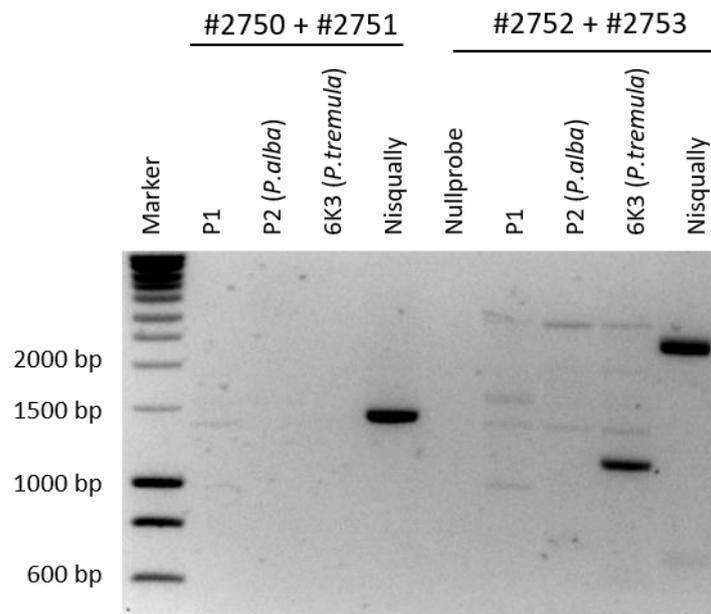


Abbildung 3.19: PCR-Amplifikation von *NFP-like3* in vier verschiedenen Pappelarten

PCR-Amplifikation von *NFP-like3* in *P. × canescens* (P1), *P. alba* (P2), *P. tremula* (6K3) und *P. trichocarpa* (Nisqually). Zur Amplifikation des ersten Introns wurde das intergenische Oligonukleotid #2750 in Kombination mit dem Oligonukleotid #2751, das im ersten Intron bindet, verwendet, erwartete Fragmentgröße 1.445 bp. Zur Amplifikation des zweiten Exons mit den umliegenden Intronbereichen wurden die Oligonukleotide #2752 und #2753 verwendet, erwartete Fragmentgröße: 2.369 bp. Marker: SmartLadder (Eurogentec, Belgien).

Unter den gewählten Bedingungen wurde das resultierende Fragment aus dem ersten Intron bis zum zweiten Exon über PCR-Amplifikation nicht erzeugt. Da die Sequenz und Annotation von *NFP-like3* in PopGenIE (http://popgenie.org/gene?id=Potra001009g08398&feature_id=799841&redirected=gbrowse; 08.05.2020) anders ist, als für P1 in der Tsai AspenDB (<http://aspen.db.uga.edu/index.php/databases/spta-717-genome>) beschrieben, wurden spezifische an *P. tremula* angepasste Oligonukleotide (#3073 und #3074) verwendet. Die Oligonukleotide sollten das gRNA3-Target im Bereich vor dem annotierten Gen amplifizieren

3 Ergebnisse

(Abbildung 3.20). Zum Nachweis des Introns/intergenischen Fragments wurde die PCR auf P1 und als Kontrolle auf einer reinen *P. tremula* (W52) durchgeführt. Zur Anpassung der PCR-Bedingungen wurden drei verschiedene Annealing-Temperaturen gewählt. Das Ergebnis der PCR ist in Abbildung 3.20 dargestellt, das erwartete Fragment mit 242 bp konnte in P1 und in der Kontrolle W52 erzeugt werden. Für die Sequenzanalyse wurden die Fragmente, die bei einer Annealing-Temperatur von 56 °C erzeugt wurden, verwendet.

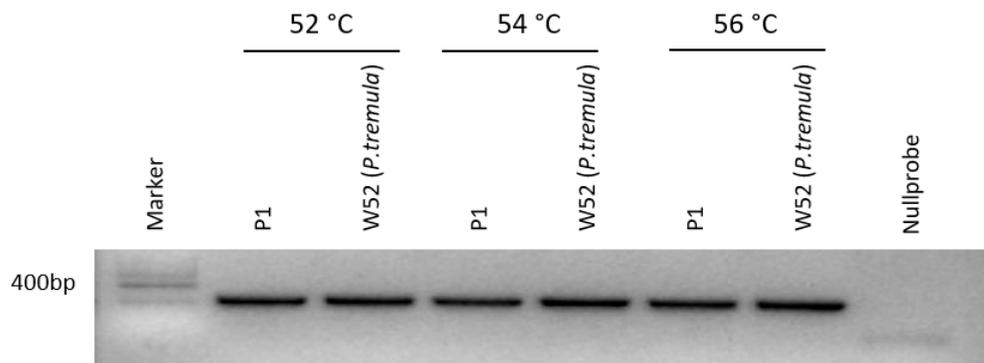


Abbildung 3.20: PCR-Amplifikation von *NFP-like3* mit Oligonukleotiden, die *NFP-like3* in *P. tremula* amplifizieren

PCR-Amplifikation von *NFP-like3* mit den Oligonukleotiden #3073 und #3074, erwartete Fragmentgröße: 242 bp. Als DNA-Matrize wurde P1-DNA und W52 (*P. tremula*)-DNA verwendet. Über den Proben befindet sich die Annealing-Temperatur, die zur Synthese verwendet wurde. Nullprobe: ohne DNA-Matrize; Marker: SmartLadder (Eurogentec, Belgien).

Die Sequenzanalyse ergab, dass es sich bei dem amplifizierten Bereich von *NFP-like3* um ein Teilbereich des *NFP-like4* handelte, in dem die gRNA lokalisiert ist. Die in PopGenIE (<http://popgenie.org/blast>) angegebene Sequenz, die vor dem annotierten Bereich von *NFP-like3* liegt, ist identisch zu der in der Tsai AspenDB (<http://aspendb.uga.edu/index.php/databases/spta-717-genome>) angegebenen Sequenz von *NFP-like4*. Dementsprechend konnten keine Oligonukleotide erstellt werden, die ausschließlich diesen Bereich von *NFP-like3* amplifizieren.

3.3.2.2 Genomische Modifikation von *NFP-like4*

Die genetische Analyse, der aus der Transformation N482 generierten, transgenen Linien erfolgte mittels PCR- und Sequenzanalyse auf DNA-Ebene. Die gewählten Oligonukleotide #2269 und #2270 zur Amplifikation der Zielfragmente konnten trotz *Mismatches* erfolgreich beide Allele amplifizieren. In Abbildung 3.21 ist beispielsweise die Amplifikation von *NFP-like4* von Linien der N482-Transformation dargestellt. In allen transgenen Linien wurde das Fragment der erwarteten Größe von 623 bp nachgewiesen. Ein größeres oder kleines

3 Ergebnisse

Amplikon konnte in keiner Linie beobachtet werden, sodass größere Insertionen und Deletionen ausgeschlossen wurden.

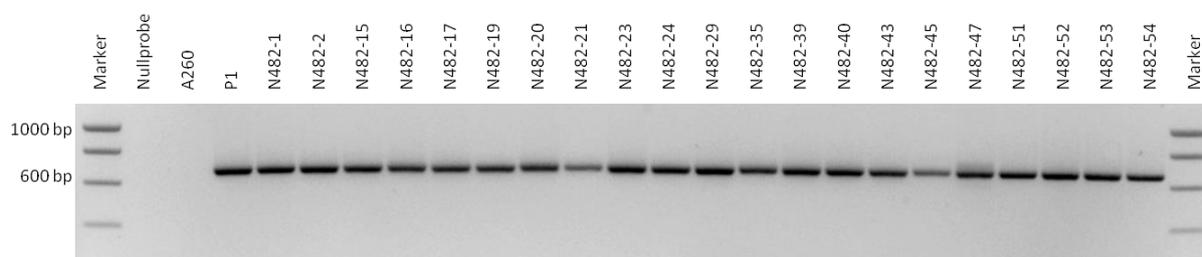


Abbildung 3.21: PCR-Amplifikation von *NFP-like4* in transgenen Linien aus der N482-Transformation

PCR-Amplifikation von *NFP-like4* in N482-Transformanten mit den Oligonukleotiden #2269 und #2270, erwartete Fragmentgröße: 623 bp. Nullprobe: ohne DNA-Matrize; A260: Transformationsvektor A260; Marker: SmartLadder (Eurogentec, Belgien).

Die Sequenzanalyse von *NFP-like4* der aus Transformation N482 hervorgegangenen Linien ergab, dass lediglich eine Linie in *NFP-like4* gRNA3-Target homozygot modifiziert war. Von den transgenen Linien waren 33 % heterozygot und 62 % entsprachen in der Sequenzanalyse genetisch dem Kontroll-Klon P1. Im gRNA4-Target konnte nur eine Linie mit einer heterozygot monoallelischen Modifikation beobachtet werden, alle anderen Linien entsprachen genetisch dem Kontroll-Klon (Tabelle 3.9).

Aus den folgenden Transformationen N489, N494 sowie N504 konnten lediglich sechs Regenerate gewonnen werden, die nachweislich die gesamte T-DNA integriert hatten. Die PCR-Amplifikation von *NFP-like4* erfolgte mit den Oligonukleotiden #2682 und #2683, die das Tremula-Allel und das Alba-Allel amplifizieren und ist beispielhaft für die Transformanten aus N489 und N494 in Abbildung 3.22 dargestellt. In allen Linien wurde ein Fragment der erwarteten Größe von 593 bp amplifiziert. Größere Insertionen oder Deletion waren nach der Auftrennung im Agarosegel nicht ersichtlich.

3 Ergebnisse

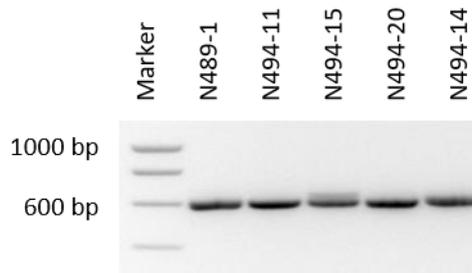


Abbildung 3.22: PCR-Amplifikation von *NFP-like4* in ausgewählten Linien der N489- und N484-Transformation

PCR-Amplifikation von *NFP-like4* mit den Oligonukleotiden #2382 und #2863, die das Tremula- und Alba-Allel amplifizieren, erwartete Fragmentgröße: 593 bp. Marker: SmartLadder (Eurogentec, Belgien).

Die durch CRISPR/Cas9 erzeugten Modifikationen sind in der nachstehenden Tabelle 3.9 für alle Transformationen aufgeführt. In den Transformationen N489, N494 und N504 konnte keine Linie erzeugt werden, die eine homozygote Modifikation im gRNA3-Target oder gRNA4-Target in *NFP-like4* aufwies. Zusammenfassend war die Modifikationsrate in *NFP-like4* gering, wobei das gRNA3-Target mehr Modifikationen aufwies als das gRNA4-Target.

Tabelle 3.9: Modifikation in *NFP-like4* in transgenen Linien zur Doppelmodifikation von *NFP-like3* und *NFP-like4*

Hom: Homozygot, Het mo: Heterozygot monoallelisch, Het bi: Heterozygot biallelisch; Chi: Chimäre; Wt: in der Sequenzanalyse genetisch identisch zum Kontroll-Klon P1; Ges: Gesamtanzahl untersuchter Regenerate.

Nummer	Modifikation gRNA3-Target						Modifikation gRNA4-Target					
	Hom	Het mo	Het bi	Chi	Wt	Ges	Hom	Het mo	Het bi	Chi	Wt	Ges
N482	1	6	1	0	13	21	0	1	0	0	20	21
N489			1			1					1	1
N494		3			1	4		3			1	4
N504			1			1					1	1

Für ausgewählte Linien sind die Modifikationen in *NFP-like4* im gRNA3-Target und gRNA4-Target tabellarisch dargestellt (Tabelle 3.10). Eine homozygote Modifikation konnte lediglich für die Linie N482-47 nachgewiesen werden. Anhand der Modifikationen in *NFP-like3* und *NFP-like4* ist die Linie N482-47 eine vielversprechende Kandidatenlinie, die für die folgenden Analysen verwendet wurde. Außerdem wurde die Linie N482-24 für die Untersuchungen verwendet und alle weiteren Linien verworfen.

Tabelle 3.10: CRISPR/Cas9-vermittelte Modifikation von *NFP-like4* am gRNA3- und gRNA4-Target von transgenen Linien der N482-Transformation

Dargestellt sind die durch CRISPR/Cas9 erzeugten Modifikationen von *NFP-like4* in ausgewählten Linien der N482-Transformation. Angegeben ist die Nummer der jeweiligen generierten transgenen Linie sowie die Modifikation im gRNA3- und gRNA4-Target. Wildtyp: in der Sequenzanalyse genetisch identisch zum Kontroll-Klon P1.

Nummer	Modifikation gRNA3-Target	Modifikation gRNA4-Target
N482-15	Heterozygot monoallelisch Insertion A	Wildtyp
N482-20	Heterozygot monoallelisch Insertion T	Wildtyp
N482-23	Wildtyp	Heterozygot monoallelisch Insertion T und Deletion A
N482-24	Heterozygot biallelisch Deletion AGC, Insertion C	Wildtyp
N482-45	Wildtyp	Wildtyp
N482-47	Homozygot Insertion T	Wildtyp
N482-51	Wildtyp	Wildtyp

3.3.2.2 Transkriptionelle Modifikation

Zum Nachweis, ob die auf genomischer DNA detektierten Modifikationen auch auf Transkript-Ebene zu finden sind, wurde von ausgewählten Regeneraten RNA aus Blatt- und Wurzelgewebe isoliert und für die Analysen in cDNA umgeschrieben. Nachdem keine DNA in den cDNA-Proben nachzuweisen war, wurden über PCR die Targetbereiche der gRNAs amplifiziert und zur Sanger-Sequenzierung eingesetzt. Die Amplifikation von *NFP-like3* erfolgte abweichend zur DNA mit den Oligonukleotiden #2679 und #2681, da zwei Transkriptvarianten von *NFP-like3* vorlagen. Mit den genannten Oligonukleotiden konnten beide Transkriptvarianten für beide Allele amplifiziert werden. In Abbildung 3.23 ist das Amplikon für *NFP-like3* unter Verwendung von cDNA aus Blatt- und Wurzelgewebe dargestellt. In Abbildung 3.23 ist deutlich zu erkennen, dass die Linie N482-47 auf cDNA aus Blattgewebe erneut drei Amplikons aufweist. Bei der Amplifikation der cDNA, die aus der RNA des Wurzelgewebes gewonnen wurde, konnte hingegen für N482-47 nur ein Amplikon mit den verwendeten Oligonukleotiden erzeugt werden. Zur Amplifikation von *NFP-like4* wurden die Oligonukleotide #2682 und #2863 verwendet, mit denen keine unterschiedlichen Fragmente nach Auftrennung im Agarosegel unter Verwendung der cDNA aus verschiedenen Geweben erzeugt wurden.

3 Ergebnisse

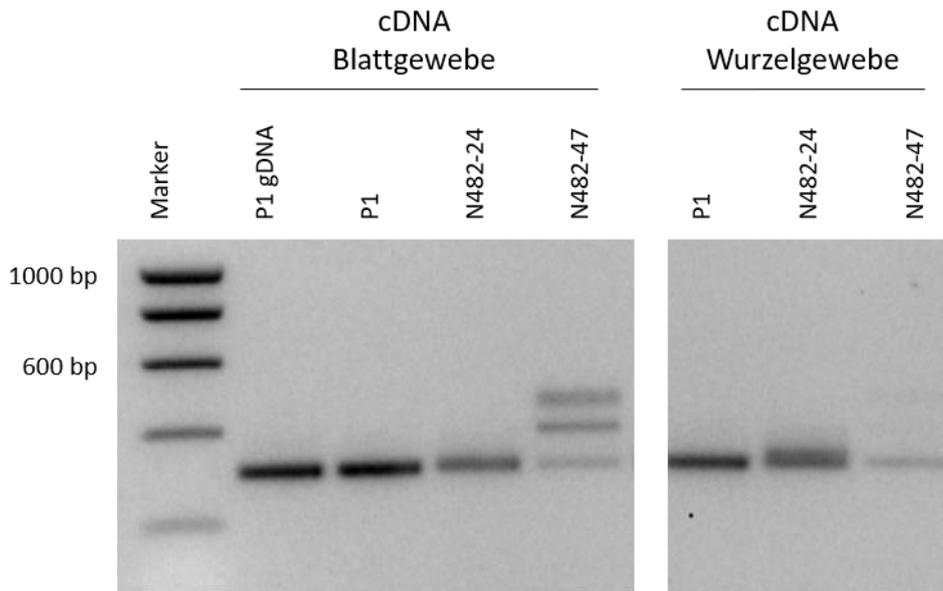


Abbildung 3.23: PCR-Amplifikation von *NFP-like3* in verschiedenen Geweben von *NFP-like3* und *NFP-like4* modifizierten transgenen Linien

PCR-Amplifikation von *NFP-like3* unter Verwendung von gDNA und cDNA aus Blatt- und Wurzelgewebe von transgenen Linien der N482-Transformation und dem nicht-transformierten Kontroll-Klon P1. Die Oligonukleotide #2679 und #2681 wurden verwendet, um die zwei verschiedenen Transkriptvarianten zu amplifizieren, erwartete Fragmentgröße: 307 bp. Marker: SmartLadder (Eurogentec, Belgien).

Die durch PCR erzeugten Amplikons von *NFP-like3* und *NFP-like4* wurden für die Sanger-Sequenzierung eingesetzt. Die in den Chromatogrammen beobachteten Modifikationen für N481-24 und N482-47 sind in Abhängigkeit des untersuchten Gens in Tabelle 3.11 für beide gRNA-Targets gelistet. Für *NFP-like3* wurde in einigen Linien eine andere Modifikation auf cDNA-Ebene im Vergleich zu den Modifikationen auf gDNA-Ebene nachgewiesen. Bei der Linie N482-47 wurde auf cDNA-Ebene des Wurzelgewebes nur das Tremula-Allel amplifiziert. Zu einer Modifikation des Alba-Allels für *NFP-like3* im Wurzelgewebe konnte dementsprechend keine Aussage getroffen werden. Die Amplifikation von *NFP-like3* auf Grundlage von cDNA aus Blattgewebe ergab drei Amplikons mit identischen Modifikationen, wie sie bereits für die genomische DNA beschrieben wurde. In der Linie N482-24 war für jedes untersuchte Gewebe für *NFP-like3* im gRNA3-Target auf cDNA-Ebene eine unterschiedliche Modifikation detektiert worden. Weiterhin unterschieden sich die Modifikationen von der genomischen Modifikation. Im Gegensatz dazu waren bei den verschiedenen Nucleinsäuren und verwendeten Geweben für beide genannte Linien keine zusätzlichen Modifikationen für *NFP-like4* nachweisbar.

Tabelle 3.11: Modifikation von *NFP-like3* und *NFP-like4* in Abhängigkeit von der analysierten Nukleinsäure und dem Gewebe transgener Linien zur Doppelmodifikation von *NFP-like3* und *NFP-like4*

Gelistet sind die Modifikationen von *NFP-like3* und *NFP-like4* in den verschiedenen isolierten Nukleinsäuren. **g3**: gRNA3-Target, **g4**: gRNA4-Target, nt: Nukleotide, Wildtyp: in der Sequenzanalyse genetisch identisch zum Kontroll-Klon P1.

Gen	Linie	DNA	cDNA Blattgewebe	cDNA Wurzelgewebe
<i>NFP-like3</i>	N482-24	g3 : Heterozygot monoallelisch Insertion T g4 : Heterozygot monoallelisch Insertion A	g3 : Heterozygot biallelisch Insertion A/ Insertion T g4 : Heterozygot monoallelisch Insertion A	g3 : Heterozygot biallelisch Insertion T/ Insertion TT g4 : Heterozygot monoallelisch Insertion A
	N482-47	g3 : Insertion 88 nt, Homozygot Insertion T g4 : Wildtyp, Heterozygot monoallelisch Insertion C, Homozygot Insertion C	g3 : Insertion 88 nt, Homozygot Insertion T g4 : Wildtyp, Heterozygot monoallelisch Insertion C, Homozygot Insertion C	g3 : Homozygot Insertion T g4 : Homozygot Insertion C
<i>NFP-like4</i>	N482-24	g3 : Heterozygot biallelisch Deletion AGC, Insertion T g4 : Wildtyp	g3 : Heterozygot biallelisch Deletion AGC, Insertion T g4 : Wildtyp	g3 : Heterozygot biallelisch Deletion AGC, Insertion T g4 : Wildtyp
	N482-47	g3 : Homozygot Insertion T g4 : Wildtyp	g3 : Homozygot Insertion T g4 : Wildtyp	g3 : Homozygot Insertion T g4 : Wildtyp

3.3.2.3 T-DNA-Integration

Die aus der Transformation N482 gewonnen transgenen Linien wurden auf die Anzahl der möglichen T-DNA-Integrationen mittels Southern-Blot-Analysen untersucht. Zur Detektion wurde sowohl die an der *right border* liegende Cas9-Nuklease Sequenz (Abbildung 3.24 A) als auch das an der *left border* liegende *nptII*-Gen (Abbildung 3.24 B) jeweils für eine spezifische Sonde verwendet.

In der Plasmid-DNA wurde für die Cas9-Sonde die erwartete Größe von 6.996 bp detektiert. In dem nicht-transformierten Kontroll-Klon P1 wurde kein Fragment detektiert, da der Kontroll-Klon P1 nicht mit dem Plasmid transformiert wurde. In der nicht-restringierten Kontrolle N482-20 unv. (unverdaut) war ein Fragment sichtbar, das deutlich über den Fragmenten der restringierten Proben lag und als Anhaltspunkt einer erfolgreichen Restriktion diente. Ist in den restringierten Proben ein Fragment in gleicher Größe vorhanden, wurde die genomische DNA nicht ausreichend fragmentiert. In den Abbildungen 3.24 A und B ist

3 Ergebnisse

erkennbar, dass die zu analysierenden Proben ausreichend restringiert wurden. In der Linie N482-45 war, trotz positivem PCR-Nachweis kein Fragment für die Cas9-Nuklease und das *nptII*-Gen detektierbar. Mit der Cas9-Sonde wurden in der Linie N482-20 zwei Fragmente, in N482-24 ein Fragment und in der Linie N482-47 drei Fragmente nachgewiesen. Dementsprechend lagen eine Zweifachintegration, Einfachintegration und eine Dreifachintegration der T-DNA vor. Der Nachweis des *nptII*-Gens ergab eine andere Integrationszahl für die Linie N482-47, es konnten lediglich zwei Fragmente detektiert werden.

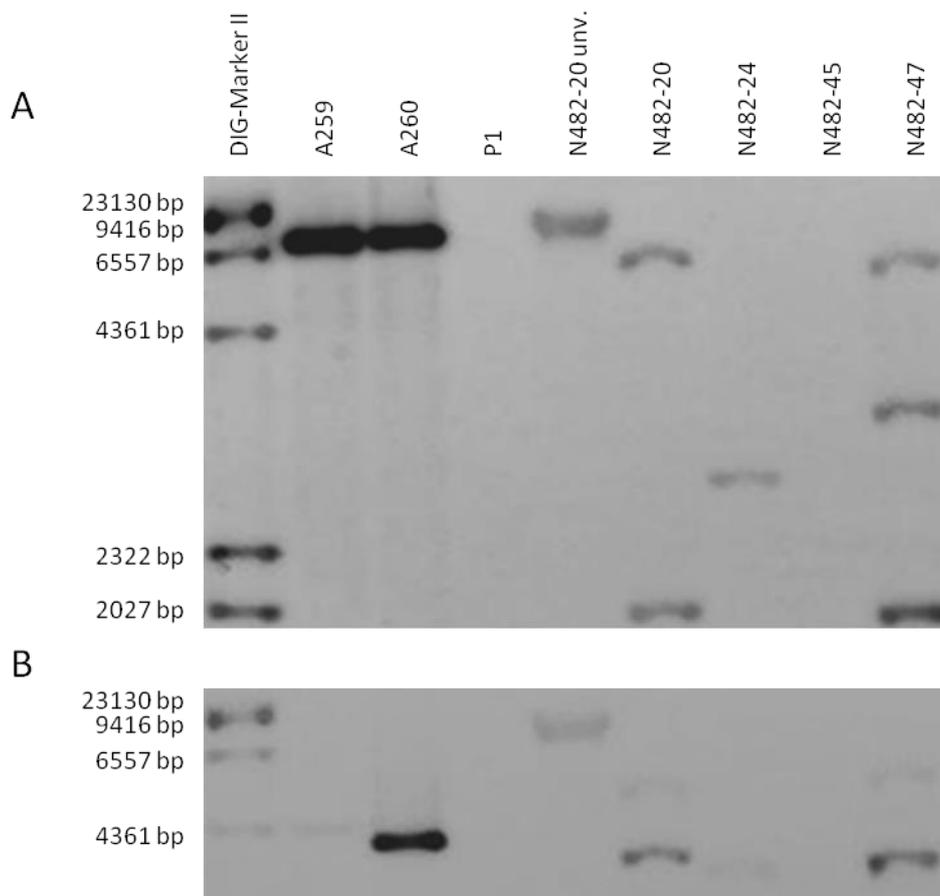


Abbildung 3.24: Southern-Blot Detektion in *NFP-like3* und *NFP-like4* transgenen Regeneraten

Detektion des Chemilumineszenz-Signals der gebundenen Sonde an die restringierte DNA nach Zugabe von Anti-Digoxigenin und CSPD. Die Plasmid-DNA und Pappel-DNA wurden mit *Bcl*I restringiert. A: Cas9-Sonde: Amplifiziert mit den Oligonukleotiden #2090 und #2540, Fragment entsprach 676 bp. Im Plasmid wird durch Hybridisierung der Cas9-Sonde ein Fragment der Größe von 6.996 bp erwartet. Im Pappelgenom wird ein Fragment von mindestens 2080 bp erwartet, dies entspricht der Fragmentgröße der restringierten T-DNA. B: *nptII*-Sonde: Amplifiziert mit den Oligonukleotiden #308 und #309, Fragment entsprach 591 bp. Im Plasmid wird durch die Restriktion und der *nptII*-Sonde ein Fragment der Größe von 4.165 bp erwartet. Im Pappelgenom wird ein Fragment von mindestens 3.055 bp, dies entspricht der Fragmentgröße der restringierten T-DNA, erwartet. DIG Marker II: DNA Molecular Weight Marker II (Roche, Schweiz) ; A259: Transformationsvektor A259; A260: Transformationsvektor A260; P1: *P. × canescens* DNA; unv.: nicht-restringierte Kontrolle.

Die Anzahl der detektierten Fragmente in den Southern-Blot-Analysen sollte für beide Sonden identisch sein, wenn die T-DNA gänzlich in das Genom integriert wurde. Die vermeintliche Anzahl der Integrationen in den N482-Transformanten ist in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Die Anzahl der detektierten Fragmente für die *nptII*-Sonde und Cas9-Sonde wichen lediglich bei der Linie N482-47 voneinander ab. In der Linie N482-45 konnte weder die Cas9-Nuklease noch das *nptII*-Gen nachgewiesen werden.

Tabelle 3.12: T-DNA-Integrationen in das Pappelgenom der N482-Transformanten

Angegeben ist die Anzahl an Integrationen, detektiert anhand spezifischer Sonden, die an Nukleinsäuren der T-DNA des A260-Vektors binden. Der Nachweis erfolgte mittels Restriktionsverdau und Southern-Blot-Analysen. Die verwendeten Sonden binden spezifisch an der Cas9-Sequenz und an dem *nptII*-Gen des Transformationsvektors A260.

Linie	Kopienzahl Cas9-Sonde	Kopienzahl <i>nptII</i> -Sonde
N482-20	2	2
N482-24	1	1
N482-45	0	0
N482-47	3	2

3.3.3 Dreifachmodifikation von *NFP-like1*, *NFP-like3* und *NFP-like4*

Zur Modifikation aller Kandidatengene wurde eine Transformation mit den Transformationsvektoren A259 und A260 durchgeführt. Die Transformationen wurden als N483 und N484 mit fortlaufender Nummer in Abhängigkeit der regenerierenden Explantate bezeichnet. Die aus der Transformation N483 resultierenden putativ transgenen Linien wurden zunächst auf Vorhandensein des *nptII*-Gens analysiert. Lediglich sieben der 17 regenerierten Pflanzen wiesen in den PCR-Analysen das *nptII*-Gen auf, obwohl die Regenerate auf kanamycinhaltigen Selektionsmedium wuchsen. Der Nachweis des gRNA-Bereichs sowie des *hph*-Gens erfolgte auf den verbliebenen sieben Regeneraten. Weitere Analysen bezüglich einer durch CRISPR/Cas9-induzierten Modifikation wurden auf den verbliebenen fünf transgenen Linien durchgeführt, die nachweislich das *hph*- und das *nptII*-Gen sowie den gRNA-Bereich im Genom integriert hatten. Alle putativ transgenen Regenerate, die aus der Transformation N484 resultierten, wurden auf den gRNA-Bereich sowie auf beide Resistenzkassetten getestet (Abbildung 3.25). Je eine Linie der 23 putativ transgenen Linien war negativ auf den Nachweis der Resistenzkassetten. Weiterhin konnte in vier Linien der gRNA-Bereich nicht nachgewiesen werden. Für Analysen einer durch CRISPR/Cas9-induzierten Modifikation konnten insgesamt 19 transgene Linien der Transformation N484 verwendet werden.

3 Ergebnisse

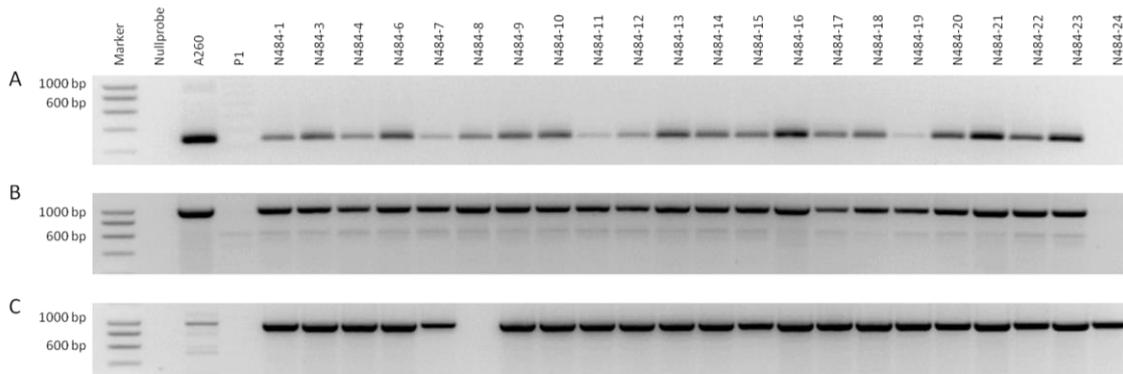


Abbildung 3.25: PCR-Nachweis der T-DNA in N484-Transformanten

PCR-Amplifikation zum Nachweis der vollständigen T-DNA-Integration in die putativ transgenen Linien A: Amplikon des gRNA-Bereiches mit den Oligonukleotiden #2419 und #2420, erwartete Fragmentgröße 227 bp. B: Amplikon des *hph*-Gens mit den Oligonukleotiden #2091 und #2092, erwartete Fragmentgröße 1027 bp. C: Amplikon des *nptII*-Gens mit den Oligonukleotiden #317 und #318, erwartete Fragmentgröße 965 bp. Marker: SmartLadder (Eurogentec, Belgien); A260: Transformationsvektor A260; *hph*- und *nptII*-Gen an der *left border*; gRNA-Bereich an der *right border*.

Die Ergebnisse zur Integration der T-DNA in das pflanzliche Genom der N483- und N484-Transformanten sind in Tabelle 3.13 zusammenfassend dargestellt. Die Analyse einer durch CRISPR/Cas9-vermittelten Modifikation erfolgte für 5 Linien aus der N483- und 19 Linien der N484-Transformation.

Tabelle 3.13: Integrationsnachweis der T-DNA in das Pappelgenom nach Transformation mit den Transformationsvektoren A259 und A260

Gelistet ist die Anzahl der Regenerate, die über den PCR-Nachweis positiv auf das jeweils zu amplifizierende Fragment der T-DNA waren. Es wurde auf den gRNA-Bereich, das *hph*- und *nptII*-Gen getestet.

Transformation	Anzahl Regenerate	Nachweis gRNA	Nachweis <i>hph</i> -Gen	Nachweis <i>nptII</i> -Gen	T-DNA integriert
N483	17	5	6	7	5
N484	24	19	22	22	19

3.3.3.1 Genomische Modifikation der *NFP-like*-Kandidatengene

NFP-like1

Zum Nachweis einer Modifikation von *NFP-like1* in den N483-Transformanten wurde über PCR mit den Oligonukleotiden #2257 und #2260 das Gesamtfragment von *NFP-like1* amplifiziert. Entgegen den PCR-Ergebnissen, die von transgenen Pflanzen der N481-Transformation erhalten wurden, konnten hier beide Allele amplifiziert werden. Die Sequenzanalyse ergab, dass eine der transgenen Linien im gRNA1-Target homozygot und drei Linien heterozygot monoallelisch modifiziert waren (Tabelle 3.15). Eine Linie war auf

3 Ergebnisse

Grund von drei Kurven mit Maxima (*peaks*) im Chromatogramm als Chimäre zu werten. Der Nachweis einer Modifikation von *NFP-like1* für die Transformation N484 erfolgte für das gRNA1-Target mit den Oligonukleotiden #2727 und #2728, das gRNA2-Target wurde mit den Oligonukleotiden #2677 und #2678 amplifiziert. Die Sequenzanalyse der N484-Transformanten ergab sechs homozygot modifizierte Linien, jeweils fünf Linien, die heterozygot monoallelisch bzw. heterozygot biallelisch modifiziert waren sowie eine Chimäre im gRNA1-Target. Weiterhin waren zwei Linien in der Sequenzanalyse genetisch identisch zum Kontroll-Klon P1. Wie bereits für die transgenen Linien aus der Transformation N481 beobachtet, konnten für die transgenen Linien im gRNA2-Target von *NFP-like1* keine Modifikation detektiert werden. Alle Linien entsprachen in der Sequenzanalyse genetisch dem Kontroll-Klon P1. Für die Funktionsanalyse aller *NFP-like*-Gene waren besonders die Linien von Interesse, die eine homozygote Modifikation zeigten, zu diesen zählten N483-8, N484-3, N484-6, N484-14, N484-18, N484-21 und N484-23.

Tabelle 3.14: Modifikation von *NFP-like1* in N483- und N484-Transformanten

Angegeben ist die Verteilung der durch CRISPR/Cas9 detektierten Modifikationen von *NFP-like1* in N483- und N484-Transformanten. Hom: Homozygot, Het mo: Heterozygot monoallelisch, Het bi: Heterozygot biallelisch; Chi: Chimäre; Wt: in der Sequenzanalyse genetisch identisch zum Kontroll-Klon P1. Ges: Gesamtanzahl untersuchter Regenerate.

Transformation	Modifikation <i>NFP-like1</i> gRNA1-Target					
	Hom	Het mono	Het bi	Chi	Wt	Ges
N483	1	3		1		5
N484	6	5	5	1	1	18

NFP-like3

Für die Modifikation in N483 wurde zunächst mit den Oligonukleotiden #2267 und #2268 nur auf eine Modifikation von *NFP-like3* im Alba-Allel getestet. Eine der fünf zu untersuchenden Linien war im gRNA3-Target als Chimäre zu werten. Eine andere Linie wies die Insertion eines Adenin-Nukleotids auf, während drei Linien genetisch dem Kontroll-Klon P1 entsprachen. Im gRNA4-Target äußerte sich in nur einer Linie eine Modifikation, die als Deletion von 74 Nukleotiden zu werten war. Die übrigen Linien entsprachen in der Sequenzanalyse genetisch dem Kontroll-Klon P1. Bei der Analyse auf die Modifikation im Tremula-Allel konnten für die Linie N483-8 drei Amplikons für *NFP-like3* erzeugt werden. Die zweite gewählte Linie N483-6 entsprach in beiden gRNA-Targets in der Sequenzanalyse genetisch dem Kontroll-Klon P1.

Die Modifikation von *NFP-like3* wurde in den N484-Transformanten direkt für beide Allele mit den Oligonukleotiden #2267 und #2330 (Abbildung 3.26) überprüft. Für drei transgene

3 Ergebnisse

Linien (N484-3, N484-6 und N484-16) konnten erneut drei Amplikons, ähnlich der Linie N482-47, nachgewiesen werden. Alle weiteren Linien zeigten ein Fragment in der erwarteten Größe von 476 bp.

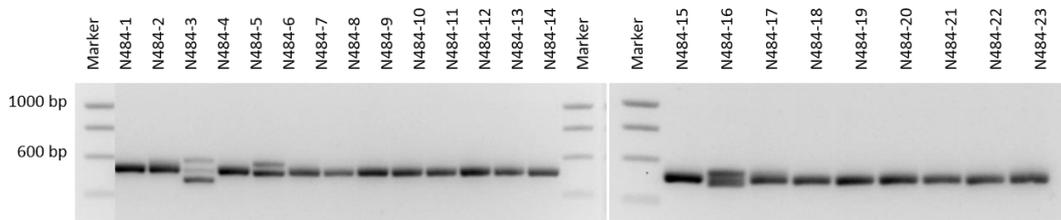


Abbildung 3.26: PCR-Amplifikation von *NFP-like3* in N484-Transformanten

PCR-Amplifikation von *NFP-like3* mit den auf dem Tremula- und Alba-Allel bindenden Oligonukleotiden #2267 und #2330, erwartete Fragmentgröße: 476 bp. Marker: SmartLadder (Eurogentec, Belgien).

Die durch Sanger-Sequenzierung nachgewiesenen Modifikationen für *NFP-like3* in den N484-Transformanten sind in Tabelle 3.15 aufgeführt. Die Linien, die mehrere PCR-Amplikons zeigten, sind in der Tabelle nicht gelistet. Im gRNA3-Target konnte keine homozygote Modifikation beobachtet werden. Genetisch dem Kontroll-Klon P1 entsprachen 17 Linien im gRNA4-Target. Lediglich eine Linie wies eine Deletion von 21 Nukleotiden zwischen dem gRNA3- und dem gRNA4-Target auf. Drei der vielversprechenden Linien, die in *NFP-like1* eine homozygote Modifikation aufwiesen, zeigten bei der Amplifikation von *NFP-like3* mehrere Amplikons und werden im folgenden Abschnitt nochmals gesondert analysiert. Die Linie N484-14 war heterozygot monoallelisch modifiziert und dementsprechend nicht für die weiteren Analysen geeignet, ebenfalls ungeeignet war die Chimäre N484-18. Die Linien N484-21 und N484-23 waren heterozygot biallelisch modifiziert und konnten als Kandidatenlinien von Interesse sein, sofern sie ebenfalls eine Modifikation in *NFP-like4* zeigen. Insbesondere, wenn für die anderen Kandidatenlinien keine Modifikation in *NFP-like4* nachweisbar wären.

Tabelle 3.15: Modifikationen von *NFP-like3* in den N484-Transformanten

Verteilung der durch CRISPR/Cas9-vermittelten und detektierten Modifikationen von *NFP-like3* in den N484-Transformanten. Het mo: Heterozygot monoallelisch, Het bi: Heterozygot biallelisch; Chi: Chimäre; Son: Sonderfall mit drei Amplikons; Wt: in der Sequenzanalyse genetisch zum Kontroll-Klon P1; Ges: Gesamtanzahl untersuchter Regenerate.

Nummer	Modifikation gRNA3-Target						Modifikation gRNA4-Target					
	Het mo	Het bi	Chi	Wt	Son	Ges	Het mo	Het bi	Chi	Wt	Son	Ges
N484	8	4	1	2	3	18	0	0	0	17	1	18

3 Ergebnisse

Bei der PCR-Analyse der Modifikation von *NFP-like3* der N483- und N484-Transformanten wurden erneut mehrere Amplikons erzeugt. Durch PCR wurden für *NFP-like3* in N483-8, N484-3 und N484-6 drei Amplikons und in N484-16 zwei Amplikons erzeugt (Abbildung 3.26). Da die Amplikons nicht direkt über Sanger-Sequenzierung analysiert werden konnten, wurde versucht, durch im Amplikon innenliegende Oligonukleotide, die Allele zu trennen. Auf Grund der starken Ähnlichkeit der beiden Allele konnte nur ein spezifisches Oligonukleotid erzeugt werden. Die Amplifikation des Alba-Allels erfolgte über die Oligonukleotide #2267 und #2726, das Tremula-Allel wurde mit #2267 und #2725 erzeugt. Die Modifikationen für N483-8, N484-3 und N484-6 sind in nachstehender Tabelle 3.17 angegeben. Für die Linie N484-16 konnten zwei Modifikationen nachgewiesen werden. Im Alba-Allel wurde eine heterozygot monoallelische Insertion eines Thymin-Nukleotids beobachtet. Im Tremula-Allel lag eine Deletion von 21 Nukleotiden zwischen dem gRNA3- und dem gRNA4-Target vor. Zusätzlich zu der Modifikation im Tremula-Allel wurde die Sequenz des Kontroll-Klons P1 nachgewiesen. Anhand der Ergebnisse waren die Linien N483-8, N484-3 und N484-6 vielversprechende Kandidatenlinien, da beide Allele in *NFP-like3* und *NFP-like1* modifiziert waren.

NFP-like4

Die Analyse zur Modifikation von *NFP-like4* erfolgte für die Transformation N483 und N484 mit den Oligonukleotiden #2269 und #2270 für beide Allele und ist für die Transformation N484 beispielhaft in Abbildung 3.27 angegeben. In allen untersuchten Linien wurde ein Fragment in der erwarteten Größe von 623 bp amplifiziert. Fragmente, die deutlich größer oder kleiner waren, konnten nicht detektiert werden, sodass größere Insertionen oder Deletionen für *NFP-like4* ausgeschlossen werden konnten.

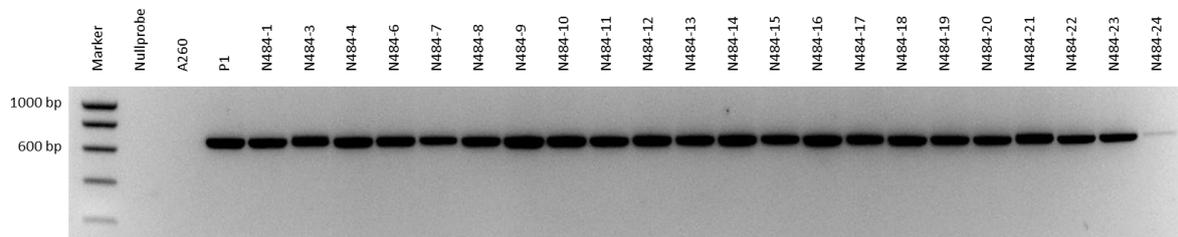


Abbildung 3.27: PCR-Amplifikation von *NFP-like4* in N484-Transformanten

PCR-Amplifikation von *NFP-like4* in N484-Transformanten mit #2269 und #2270, erwartete Fragmentgröße 623 bp. Nullprobe: ohne DNA-Matrize; A260: Transformationsvektor A260; Marker: SmartLadder (Eurogentec, Belgien).

3 Ergebnisse

Die durch Sanger-Sequenzierung detektierten Modifikationen sind in Tabelle 3.16 gelistet. Die Transformation N483 ergab eine Linie, N483-8, in der eine homozygote Modifikation im gRNA3-Target von *NFP-like4* vorlag. Im gRNA4-Target konnten für die N483-Transformanten keine homozygoten Modifikationen nachgewiesen werden. Die Transformation N484 resultierte in vier homozygot modifizierten Linien für das gRNA3-Target (N484-3, N484-6, N484-20 und N484-23). Lediglich eine Linie, N484-23, war im gRNA4-Target homozygot modifiziert. Der Großteil der Linien wies keine Modifikation im gRNA4-Target von *NFP-like4* auf.

Tabelle 3.16: Modifikation von *NFP-like4* in den N483- und N484-Transformanten

Angegeben ist die Verteilung der durch CRISPR/Cas9 detektierten Modifikationen von *NFP-like4* in N483- und N484-Transformanten. Homo: Homozygot, Het mo: Heterozygot monoallelisch, Het bi: Heterozygot biallelisch; Chim: Chimäre; Wt: in der Sequenzanalyse genetisch zum Kontroll-Klon P1; Ges: Gesamtanzahl untersuchter Regenerate.

Nummer	Modifikation gRNA3-Target						Modifikation gRNA4-Target					
	Hom	Het mo	Het bi	Chi	Wt	Ges	Hom	Het mo	Het bi	Chi	Wt	Ges
N483	1	3		1		5		2			3	5
N484	4	8	0	1	5	18	1	1	0	0	16	18

Anhand der Modifikationen für *NFP-like1*, *NFP-like3* und *NFP-like4* wurden vier transgene Regenerate für die weiteren Analysen ausgewählt. Die Modifikationen dieser Linien sind für alle Kandidatengene in Tabelle 3.17 aufgeführt. In den Linien N483-8, N484-3 und N484-6 wurden Modifikationen in allen Kandidatengenen nachgewiesen. Die Linie N484-23 zeigte ebenfalls in allen Kandidatengenen Modifikationen, wurde aber für die folgenden Analysen nicht verwendet.

Tabelle 3.17: CRISPR/Cas9-vermittelte Modifikation von *NFP-like1*, *NFP-like3* und *NFP-like4* in N483- und N484-Transformanten

Dargestellt sind die Modifikationen in den N483- und N484-Transformanten in Abhängigkeit vom modifizierten Kandidatengen auf DNA-Ebene. **g1**: gRNA1-Target, **g2**: gRNA2-Target, **g3**: gRNA3-Target, **g4**: gRNA4-Target. **Alba**: Alba-Allel, **Tremula**: Tremula-Allel; Wildtyp: in der Sequenzanalyse genetisch identisch zum Kontroll-Klon P1.

Linie	Modifikation		
	<i>NFP-like1</i>	<i>NFP-like3</i>	<i>NFP-like4</i>
N483-8	g1 : Homozygot Deletion A g2 : Wildtyp	Alba g3 : Insertion A g4 : Deletion 74 nt Tremula (1) : g3 : Insertion T g4 : Insertion T Tremula (2) g3 : Insertion A g4 : Deletion 74 nt	g3 : Homozygot Insertion A g4 : Heterozygot monoallelisch Deletion ATAAG
N484-3	g1 : Homozygot Deletion A g2 : Wildtyp	Alba g3 : Insertion A g4 : Insertion A Tremula (1) g3 : Insertion T g4 : Deletion 52 nt Tremula (2) g3 : Insertion TT g4 : Deletion 52 nt	g3 : Homozygot Insertion T g4 : Heterozygot monoallelisch Deletion CATAAGG
N484-6	g1 : Homozygot Deletion A g2 : Wildtyp	Alba g3 : Insertion A g4 : Wildtyp Tremula g3 : Deletion ACCG g4 : Wildtyp	g3 : Homozygot Insertion T g4 : Wildtyp
N484-20	g1 : Homozygot Deletion A g2 : Wildtyp	g3 : Heterozygot biallelisch Insertion T/ Insertion A g4 : Wildtyp	g3 : Homozygot Insertion T g4 : Wildtyp
N484-23	g1 : Homozygot Deletion A g2 : Wildtyp	g3 : Heterozygot biallelisch Insertion T/ Insertion TT g4 : Wildtyp	g3 : Homozygot Insertion T g4 : Wildtyp

3.3.3.2 Transkriptionelle Modifikation

Zum Nachweis, ob die beobachteten Modifikationen auf DNA-Ebene auch auf RNA-Ebene vorhanden sind, wurde von ausgewählten Regeneraten RNA aus Blatt- und Wurzelgewebe isoliert und für die Analysen in cDNA umgeschrieben. Nach dem Ausschluss einer DNA-Kontamination der cDNA wurden die Targetbereiche der gRNAs über PCR amplifiziert und zur Sanger-Sequenzierung eingesetzt. Die resultierenden Modifikationen sind in Tabelle 3.18 gelistet. Die Modifikationen von *NFP-like1* waren in allen Geweben auf cDNA-Ebene

3 Ergebnisse

identisch denen auf DNA-Ebene und sind daher nicht in nachstehender Tabelle 3.18 aufgeführt.

Tabelle 3.18: *NFP-like3* und *NFP-like4* Modifikation im Blatt- und Wurzelgewebe von N483- und N484-Transformanten

Dargestellt sind die Modifikationen der N483- und N484 Transformanten in Abhängigkeit vom modifizierten Kandidatengen. **g3**: gRNA3-Target, **g4**: gRNA4-Target. Alba: Alba-Allel, Tremula: Tremula-Allel; nt: Nukleotide; Wildtyp: in der Sequenzanalyse identisch zum Kontroll-Klon P1.

Linie	cDNA	<i>NFP-like3</i>	<i>NFP-like4</i>
N483-8	Blatt	Alba g3 : Insertion A g4 : Deletion 74 nt Tremula ₍₁₎ : g3 : Insertion T g4 : Insertion T Tremula ₍₂₎ g3 : Insertion G g4 : Insertion T	g3 : Homozygot Insertion T g4 : Heterozygot monoallelisch Deletion ATAAGG
	Wurzel	Alba g3 : Insertion A g4 : Deletion 74 nt Tremula ₍₁₎ : g3 : Insertion T g4 : Insertion T	g3 : Homozygot Insertion T g4 : Heterozygot monoallelisch Deletion ATAAGG
N484-3	Blatt	Alba g3 : Insertion A g4 : Insertion A Tremula g3 : Insertion T g4 : Deletion 52 nt	g3 : Homozygot Insertion T g4 : Heterozygot monoallelisch Deletion CATAAGG
	Wurzel	Alba g3 : Insertion A g4 : Insertion A Tremula g3 : Insertion TT g4 : Deletion 52 nt	g3 : Homozygot Insertion T g4 : Heterozygot monoallelisch Deletion CATAAGG
N484-6	Blatt	Alba g3 : Insertion A g4 : Wildtyp Tremula g3 : Deletion ACCGA g4 : Wildtyp	g3 : Homozygot Insertion T g4 : Wildtyp
	Wurzel	Alba g3 : Insertion A g4 : Wildtyp Tremula g3 : Deletion CCGA g4 : Wildtyp	g3 : Homozygot Insertion T g4 : Heterozygot monoallelisch Insertion C

Für *NFP-like3* unterschieden sich die Modifikationen auf cDNA-Ebene zwischen Blatt- und Wurzelgewebe für alle transgenen Linien. Weiterhin unterscheiden sich die Modifikationen zwischen cDNA- und DNA-Ebene für *NFP-like3*. Beispielsweise wurden zwei Versionen für das Tremula-Allel von N483-8 beobachtet. Eine der zwei Versionen zeigte auf Grundlage der cDNA aus Blattgewebe eine andere Modifikation als auf DNA-Ebene. Der Unterschied bestand darin, dass das Tremula-Allel auf DNA-Ebene im gRNA3-Target eine Insertion eines einzelnen Adenin-Nukleotids sowie im gRNA4-Target eine Deletion von 74 Nukleotiden aufwies. Bei cDNA aus Blattgewebe hingegen war die Insertion eines einzelnen Guanin-Nukleotids im gRNA3-Target und die Insertion eines einzelnen Thymin-Nukleotids im gRNA4-Target beobachtet worden. Für die cDNA aus Wurzelgewebe lag nur eine Version des Tremula-Allels vor. Die Modifikation für *NFP-like4* war für die Linien N483-8 und N484-3 auf cDNA-Ebene in beiden Geweben sowie auf DNA-Ebene identisch. Für die cDNA aus Wurzelgewebe, im Vergleich zur cDNA aus Blattgewebe und auf DNA-Ebene, war eine abweichende Modifikation in N484-6 im gRNA4-Target von *NFP-like4* zu finden.

3.3.3.3 T-DNA-Integration

Die aus der Transformation N483 und N484 erzeugten transgenen Linien wurden auf die Anzahl der möglichen T-DNA-Integrationen mittels Southern-Blot-Analysen untersucht. Da es sich bei den Linien um Doppeltransformanten handelte, wurde die an der *right border* liegende Cas9-Nuklease Sequenz für die spezifische Sonde verwendet (Abbildung 3.28 A). Die Cas9-Nuklease war in beiden verwendeten Transformationsvektoren vorhanden, sodass zusätzlich auf die an der *left border* liegenden *hph*- und *nptII*-Gene getestet wurde (Abbildung 3.28 B und C). In der Plasmid-DNA wurde für die Cas9-Sonde ein Fragment in der erwarteten Größe von 6.996 bp detektiert, ebenfalls den Erwartungen entsprechend wurde in der nicht-transformierten Kontrolle P1 kein Fragment detektiert. In den Detektionen des *nptII*- und des *hph*-Gens ließ sich erkennen, dass diese jeweils nur in der einen Plasmid-Kontrolle vorhanden waren. Die Fragmente entsprachen der erwarteten Größe. Zum Nachweis der erfolgreichen Fragmentierung durch das genutzte Restriktionsenzym, wurde eine nicht-restringierte Probe (N483-6 unv.) aufgetragen, die für die Cas9- und *nptII*-Detektion ein deutlich größeres Fragment zeigte als die Fragmente der restringierten Proben. Für die Cas9-Integration wurden mehr Fragmente detektiert als für die *hph*- und *nptII*-Integration. Ursächlich dafür ist die in beiden Transformationsvektoren vorhandene Cas9-Nuklease Sequenz. In der Linie N483-6 konnte kein *nptII*-Fragment detektiert werden.

3 Ergebnisse

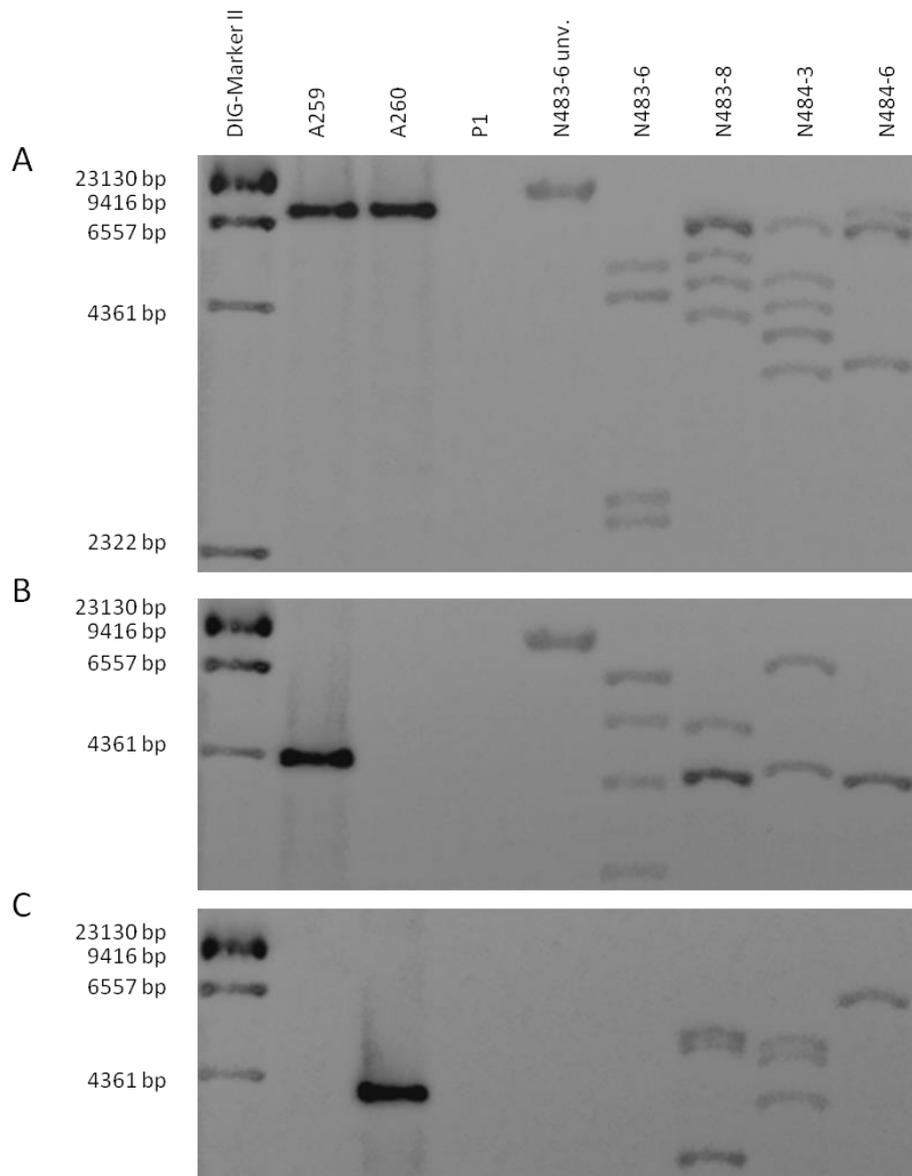


Abbildung 3.28: Southern-Blot-Detektion in ausgewählten Linien zur Dreifachmodifikation in *NFP-like1*, *NFP-like3* und *NFP-like4*

Detektion des Chemilumineszenz-Signals der hybridisierten Sonde an die restringierte DNA nach Zugabe von Anti-Digoxigenin und CSPD. Die Plasmid- und Pappel-DNA wurden mit *Bcl*I restringiert. A: Cas9- Nachweis: Die Cas9-Sonde wurde mit den Oligonukleotiden #2090 und #2540 amplifiziert und entsprach einer Größe von 676 bp. Im Plasmid wird durch die Hybridisierung mit der Cas9-Sonde ein Fragment von mindestens 2.080 bp erwartet, dies entspricht der Fragmentgröße der restringierten T-DNA B: *hph*-Sonde: Die *hph*-Sonde wurde mit den Oligonukleotiden #2571 und #2560 erzeugt und entsprach einer Größe von 454 bp. Im Plasmid wird durch die Restriktion und Hybridisierung der *hph*-Sonde ein Fragment der Größe von 4403 bp erwartet. Im Pappelgenom wird ein Fragment von mindestens 2.381 bp, dies entspricht der Fragmentgröße der restringierten T-DNA, erwartet. C: *nptII*-Sonde: Die *nptII*-Sonde wurde mit den Oligonukleotiden #308 und #309 erstellt und entsprach einer Größe von 591 bp. Im Plasmid wird durch die Restriktion und der Hybridisierung mit der *nptII*-Sonde ein Fragment der Größe von 4.165 bp erwartet. Im Pappelgenom wird ein Fragment von mindestens 3055 bp, dies entspricht der Fragmentgröße der restringierten T-DNA, erwartet. A259: Transformationsvektor; A260: Transformationsvektor A260; P1: *P. × canescens* DNA; unv.: nicht-restringierte Kontrolle. DIG- Marker II: DNA Molecular Weight Marker II (Roche, Schweiz).

3 Ergebnisse

Durch die im Southern-Blot detektierten Fragmente der Cas9-Nuklease und der Resistenzkassetten konnte die Anzahl der im Genom integrierten T-DNAs in den N483- und N484-Transformanten bestimmt werden. Wie aus Tabelle 3.19 ersichtlich, konnte in keiner der gewählten Linien eine Einfachintegration der T-DNA nachgewiesen werden. Die Cas9-Sonde hybridisierte an insgesamt fünf Teilstücken der restringierten DNA für die Linie N484-3. Die Anzahl stimmte mit den nachgewiesenen Integrationen für die *nptII*- und *hph*-Sonde überein. Die N483-6 Linie schien nur die T-DNA des Transformationsvektors A259 integriert zu haben, da die Cas9-Sonde viermalig detektiert wurde, ebenso die *hph*-Sonde. Das *nptII*-Gen der T-DNA des Transformationsvektors A260 konnte nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 3.19: Nachweis der T-DNA-Integrationsanzahl in Linien zur Dreifachmodifikation in *NFP-like1*, *NFP-like3* und *NFP-like4*

Anzahl der durch Southern-Blot-Analysen nachgewiesenen Fragmente unter Verwendung spezifischer Sonden für den gRNA-Bereich und der Resistenzkassetten der T-DNA der transformierten Vektoren A259 und A260.

Linie	Kopienzahl Cas9-Sonde	Kopienzahl <i>nptII</i> -Sonde	Kopienzahl <i>hph</i> -Sonde
N483-6	4	0	4
N483-8	4	3	2
N484-3	5	3	2
N484-6	3	1	1

3.3.4 Nachweis der Integrationsorte

Zum Nachweis der Integrationsorte wurde die TAIL-PCR mit einem spezifischen Oligonukleotid und einem degenerierten Oligonukleotid durchgeführt, um aus der T-DNA heraus in das Pappelgenom zu amplifizieren. Mit Ausnahme der Linie N482-24, für die eine Einfachintegration in den Southern-Blot-Analysen nachgewiesen wurde, wiesen alle anderen untersuchten transgenen Linien bis zu sechs vermeintliche Integrationen auf. In die TAIL-PCR-Analyse wurden die in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen transgenen Linien eingesetzt. In Abbildung 3.29 ist eine der durchgeführten TAIL-PCR's von TAIL I bis TAIL III dargestellt. Die für die Sanger-Sequenzierung aus dem Agarosegel ausgestanzten und eluierten PCR-Fragmente sind mit einem roten Stern markiert. Die Fragmente, die bei der Sanger-Sequenzierung einen Locus im Pappelgenom wiedergaben, sind mit einer Nummer versehen.

3 Ergebnisse

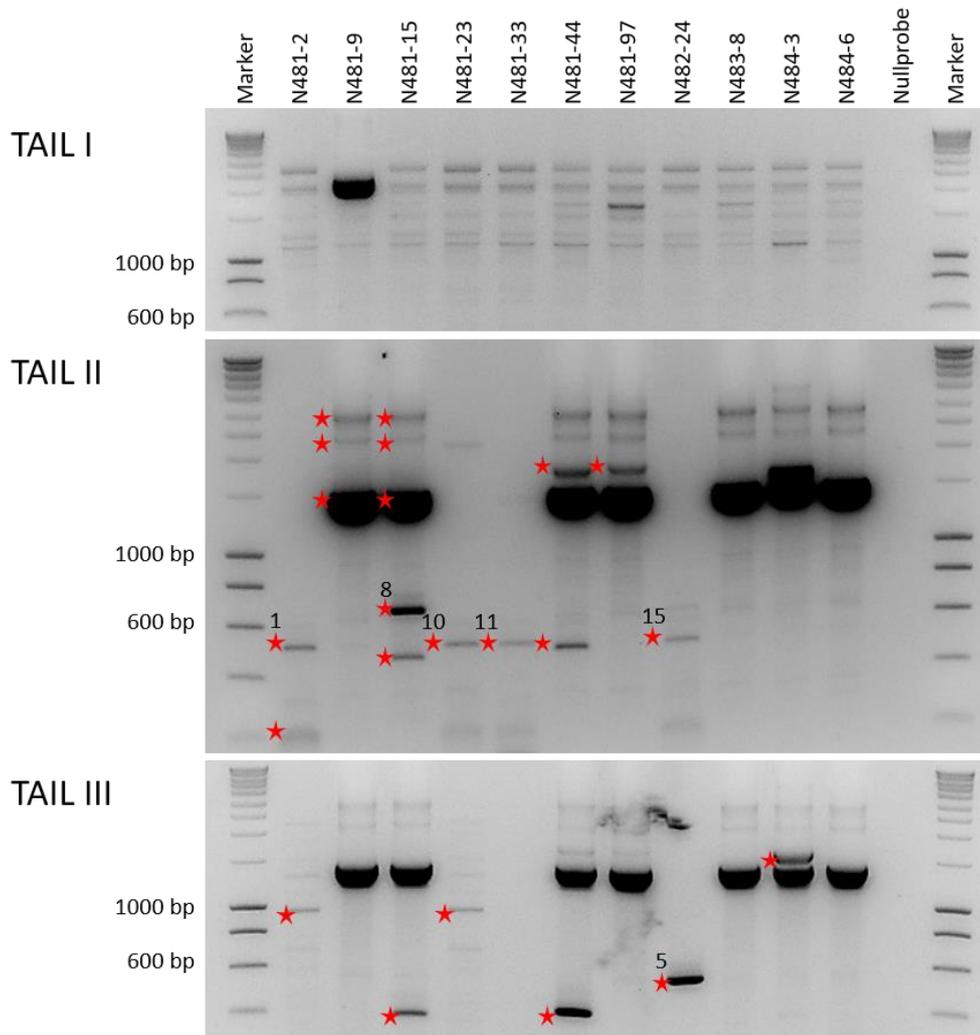


Abbildung 3.29: Dokumentation der TAIL-PCR für ausgewählte transgene Kandidatenlinien
PCR-Nachweis nach erfolgter TAIL I, TAIL II und TAIL III. Die zur Sanger-Sequenzierung aufgereinigten PCR-Amplikons sind durch einen roten Stern gekennzeichnet. Die Zahlen geben das aufgereinigte Fragment für die Sanger-Sequenzierung an. Nullprobe: ohne DNA-Matrize; Marker: SmartLadder (Eurogentec, Belgien).

Die Ergebnisse der Sequenzanalyse sind in Tabelle 3.20 im Ansatz I und II zu finden, wobei die Ergebnisse im Ansatz I den ausgeschnittenen Fragmenten der TAIL II und die Ergebnisse in Ansatz II den ausgeschnittenen Fragmenten der TAIL III entsprechen. Es konnte nicht für jedes aufgereinigte Fragment ein Locus im Pappelgenom nachgewiesen werden. Auf Grund dessen wurde die TAIL-PCR wiederholt und Fragmente ausschließlich aus der TAIL III in die Sanger-Sequenzierung eingesetzt (Tabelle 3.20 Ansatz III). In der wiederholt durchgeführten TAIL-PCR konnten nicht für alle Linien die noch fehlenden Integrationsorte bestimmt werden. Den Linien N481-97, N483-8, N484-3 und N484-6 konnte nicht ein einziger Integrationsort der T-DNA zugeordnet werden. Die gewonnen Sequenzdaten wurden zur Analyse in der Tsai AspenDB (<http://aspensdb.uga.edu/index.php/databases/spta-717-genome>)

3 Ergebnisse

gegen das Genom des Pappelklons INRA 717-1B4 geblastet und das Ergebnis für beide Allele mit dem niedrigsten E-Wert ist in Tabelle 3.20 gelistet. Zur Bestimmung der Integrationsposition wurden die Sequenzen ebenfalls in Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) gegen das *P. trichocarpa* Genom geblastet. Im Ansatz I konnten vier aufgereinigte Fragmente erfolgreich sequenziert werden. Insgesamt wiesen drei der vier Fragmente in den Sequenzergebnissen neun oder mehr mögliche Positionen im Genom auf. In Tabelle 3.20 ist der niedrigste E-Wert mit der höchsten identischen Nukleotidanzahl angegeben. Im Ansatz I waren die Integrationen intergenisch auf Chromosom 2, 18 oder 19 bzw. im Scaffold 32 zu finden. Im Ansatz II integrierte die T-DNA mit hoher Wahrscheinlichkeit in Potri.017G145800. Nennenswert ist, dass im Ansatz III fünf der sechs analysierten Fragmente vermeintlich in Potri.009G049100 integrierten. Für die Linie N482-24 wurden über TAIL-PCR und anschließender Sequenzierung zwei genomische Positionen für die T-DNA detektiert, obwohl anhand des Southern-Blots für die Cas9-Sonde und die *nptII*-Sonde jeweils nur ein Fragment nachgewiesen wurde.

Tabelle 3.20: Analyse der durch TAIL-PCR erzeugten Fragmente zur Integrationsbestimmung der T-DNA in das Pappelgenom transgener Linien

Gelistet sind die nach der TAIL-PCR aus dem Agarosegel eluierten und zur Sanger-Sequenzierung eingesetzten PCR-Fragmente zum Nachweis der T-DNA-Integration. E-Wert nach *Blast*-Analysen in der Tsai AspenDB (<http://aspenDB.uga.edu/index.php/databases/spta-717-genome>) unter Verwendung des *P. × canescens* (P1) Genoms, Loci anhand *Blast*-Analysen im *P. trichocarpa* Genom unter Verwendung von Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). A: Ansatz; Amp: Nummer des ausgestanzten Amplikons; nt: Nukleotide.

A	Linie	Amp.	Loci	Allel	E-Wert	Score	Identische nt	Hits
I	N481-2	1	Chr. 18 intergenisch	Tremula	0,0	708	416/430 (97 %)	10
			Scaffold 32	Alba	0,0	701	409/432 (97 %)	9
	N481-9	8	Chr.2 intergenisch	Tremula	8E-108	392	212/212 (100 %)	1
				Alba	6E-94	346	204/212 (96 %)	1
	N481-23	10	Chr. 19 intergenisch	Tremula	8E-65	248	149/156 (96 %)	10
				Alba	2E-76	287	155/155 (100 %)	9
N481-33	11	Chr. 19 intergenisch	Tremula	1E-67	257	144/146 (99 %)	12	
		Chr. 18 intergenisch	Alba	2E-71	270	146/146 (100 %)	12	
II	N482-24	15	Chr. 17 Potri.017G145800.1	Tremula	3E-71	276	149/149 (100 %)	2
				Alba	3E-71	270	148/149 (99 %)	2
III	N481-2	2	Chr. 9 Potri.009G049100.1	Tremula	1E-57	224	132/137 (96 %)	1
				Alba	6E-61	235	134/137 (98 %)	1
	N481-15	22	Chr. 2 intergenisch	Tremula	3E-55	217	117/117 (100 %)	1
				Alba	1E-44	182	111/117 (95 %)	1
	N481-23	7	Chr. 9 Potri.009G049100.1	Tremula	2E-56	220	128/132 (97 %)	1
				Alba	7E-60	231	131/132 (98 %)	1
	N481-33	9	Chr. 9 Potri.009G049100.1	Tremula	2E-56	231	128/132 (97 %)	1
				Alba	7E-60	231	130/132 (98 %)	1
	N481-44	11	Chr. 9 Potri.009G049100.1	Tremula	9E-59	228	131/135 (97 %)	1
				Alba	4E-62	239	133/135 (99 %)	1
	N482-24	14	Chr. 9 Potri.009G049100.1	Tremula	2E-55	217	126/129 (97 %)	1
				Alba	9E-59	228	127/129 (98 %)	1

3.3.5 Analyse der CRISPR/Cas9 Modifikation in Abhängigkeit von der Zeit

Um die Möglichkeit einer weiteren Modifikation der Cas9-Nuklease an der bereits modifizierten gRNA-Position zu untersuchen, wurden 7 Monate nach der ersten DNA-Isolation und Sanger-Sequenzierung weitere Analysen der ausgewählten, transgenen Linien vorgenommen. In den 7 Monaten wurden die Pflanzen ca. sechsmalig über Kopfstecklinge für die Vermehrung auf neues Medium umgesetzt. Die durch CRISPR/Cas9 detektierten Modifikationen umfassten zum Teil nur die Deletion oder Insertion eines einzelnen Nukleotids, sodass die gRNA mit einem einzelnen *Mismatch* theoretisch an das bereits modifizierte Target binden könnte. Die Untersuchung diente der Analyse, wie stabil die detektierten Modifikationen an der Target-Position waren, insbesondere dessen, da die Cas9-

Nuklease konstitutiv exprimiert und die T-DNA stabil in das Genom der Pflanze integriert wurde.

Die Analyse der transgenen Linien zur Erzeugung einer Einzelmodifikation ergab keine zusätzlichen Modifikationen in den Linien N481-9, N481-15, N481-23, N481-44 und N481-97. Lediglich bei der Linie N481-2 wurde bei der zweiten Sanger-Sequenzierung ein chimärer Status beobachtet.

Eine zusätzliche Veränderung in den Linien N482-20, N482-24, N482-45 und N482-47 zur Erzeugung einer Doppelmodifikation in *NFP-like3* und *NFP-like4* konnte weder für *NFP-like3* noch *NFP-like4* nachgewiesen werden. Diesbezüglich wurde für *NFP-like3* lediglich das Alba-Allel, für *NFP-like4* beide Allele betrachtet. Besonders erwähnenswert ist, dass sogar Targetbereiche, die in der Sequenzanalyse genetisch dem Kontroll-Klon P1 entsprachen, auch zum zweiten Analysezeitpunkt keine Modifikation aufwiesen.

Anders verhält es sich für die Linien N483-6 und N483-8 aus der Dreifachmodifikation von *NFP-like1*, *NFP-like3* und *NFP-like4*. Für *NFP-like1* konnten für beide Linien keine zusätzlichen Modifikationen nachgewiesen werden. Die Linie N483-8 zeigte eine andere Modifikation in *NFP-like4*, N483-6 eine andere Modifikation in *NFP-like3* und *NFP-like4*. *NFP-like4* hat sich in der Linie N483-8 dahingehend verändert, dass im gRNA3-Target bei der ersten Sanger-Sequenzierung eine heterozygot monoallelische Modifikation, in der zweiten Sequenzierung ein homozygoter Zustand der Modifikation vorlag. Zusammenfassend zeigte sich, dass die Modifikationen mit Ausnahme der Linien N483-6 und N483-8 stabil waren und nicht weiter von der Cas9-Nuklease modifiziert wurden.

3.3.6 OFF-Target-Analyse

Zum Nachweis einer Modifikation an möglichen OFF-Targets wurden anhand von CRISPR-P 2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR2/CRISPR>) die OFF-Targets mit dem höchsten OFF-Target Score bestimmt. Anhand der angegebenen OFF-Target-gRNA und dem zugehörigen Locus in *P. trichocarpa* wurde die Sequenz aus Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) entnommen. Mittels der *P. trichocarpa* Sequenz konnte die passende Sequenz für das Tremula- und Alba-Allel der Tsai AspenDB (<http://aspenDB.uga.edu/index.php/databases/spta-717-genome>) entnommen werden (Tabelle 3.21).

Tabelle 3.21: OFF-Targets der verwendeten gRNAs

Angegeben sind die OFF-Target-Sequenzen mit dem höchsten OFF-Score, berechnet von CRISPR-P 2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR2/CRISPR>). Die PAM-Sequenz ist fett und unterstrichen hervorgehoben. Nukleotide, die von der Sequenz der verwendeten gRNA abweichen, sind rot gekennzeichnet. MM: *Mismatch*; Chr.: Chromosom.

gRNA	Art	gRNA Sequenz OFF-Target	MM	Chr.	OFF-Score	Modifiziert
gRNA1	Trichocarpa	<u>TAGTTGAGTTGGAAAAAATAAGG</u>	4	17	0,625	
	Tremula	<u>CTAGTGATTTGGAAAAAATAAG</u>	5	17		Nein
	Alba	<u>CTAGTGATTTGGAAAAAATAAG</u>	5	17		Nein
gRNA2	Trichocarpa	<u>CCGAAATGTGGAATGAGAAGAA</u>	1	14	0,643	
	Tremula	<u>CCTGAAATGTGGAATCGAGAAGA</u>	1	14		Nein
	Alba	<u>CCCGAAATGTGGAATCGAGAAGA</u>	1	14		Nein
gRNA3	Trichocarpa	<u>TTGGTTGGGCTTGCAAATGGTGG</u>	1	10	0,636	
	Tremula	<u>TTGGTTGGGCTTGCAAATGGTGG</u>	1	10		Nein
	Alba	<u>TTGGTTGGGCTTGCAAATGGTGG</u>	1	10		Nein
gRNA4	Trichocarpa	<u>CCATATGATATCAAAGCCAGTT</u>	3	10	0,640	
	Tremula	<u>CCATATGATATCAAAGCCTGGTT</u>	5	10		Nein
	Alba	<u>CCATATGATATCAAAGCCCAATT</u>	5	10		Nein

Über PCR-Amplifikation der gRNA-Targetbereiche der potentiellen OFF-Targets und Sanger-Sequenzierung wurde nachgewiesen, ob in den OFF-Targets der transgenen Linien eine Modifikation vorhanden war. Neben fünf transgenen Linien wurde der nicht-transgene Kontroll-Klon P1 für die Amplifikation und Sanger-Sequenzierung eingesetzt. Die gRNA mit dem höchsten OFF-Score zur gRNA1 befand sich intergenisch auf Chromosom 17. Das Amplikon wurde mit den Oligonukleotiden #2689 und #2690 für das Alba-Allel und mit den Oligonukleotiden #3016 und #3017 für das Tremula-Allel erzeugt (Abbildung 3.30). Bei der Sequenzanalyse der transgenen Linien N481-44, N481-97, N483-8, N484-3 und N484-6 konnte keine Modifikation an dem möglichen OFF-Target nachgewiesen werden. Das OFF-Target zur gRNA2 wurde mit den Oligonukleotiden #2691 und #2692 erzeugt (Abbildung 3.30). Ebenso bei dem OFF-Target zur gRNA2, das sich im Exonbereich von Potri.014G112500 befand, wurde keine Modifikation in den genannten transgenen Linien beobachtet. Die OFF-Targets der gRNA3 und gRNA4 befanden sich beide auf Chromosom 10. Das OFF-Target der gRNA3 lag vor der gRNA3 in *NFP-like4* und konnte mit den verwendeten Oligonukleotiden #2862 und #2683 zur Analyse der Modifikation in *NFP-like4* mit amplifiziert werden. Das OFF-Target der gRNA4 befand sich intergenisch auf Chromosom 10 und wurde mit den Oligonukleotiden #2699 und #2700 für das Tremula-Allel und mit den Oligonukleotiden #2701 und #2702 für das Alba-Allel erzeugt. Alle Amplifikationen resultierten in PCR-Fragmenten der erwarteten Größe. Anhand der Sanger-Sequenzierung wurden keine Modifikationen in den OFF-Targetbereichen nachgewiesen.

3 Ergebnisse

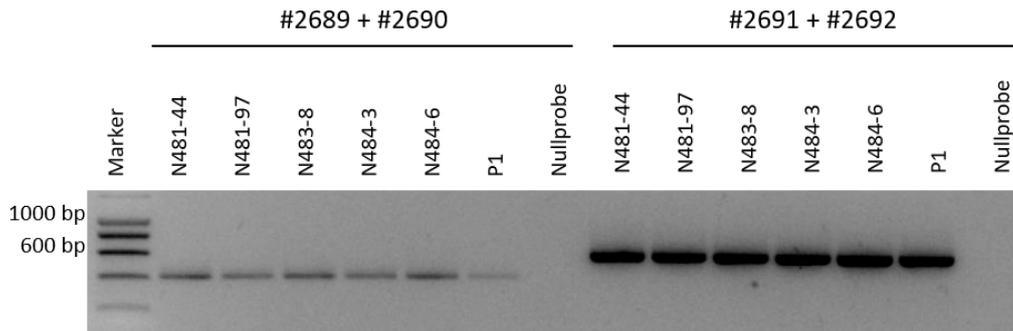


Abbildung 3.30: Amplifikation der OFF-Targets für gRNA1 und gRNA2

Agarosegelbilder der Amplifikation des OFF-Targets von gRNA1 und gRNA2. Das Alba-Allel im OFF-Target der gRNA1 wurde mit den Oligonukleotiden #2689 und #2690 erzeugt, erwartete Fragmentgröße: 422 bp. Das OFF-Target von gRNA2 wurde mit den Oligonukleotiden #2691 und #2692 erzeugt, erwartete Fragmentgröße: 588 bp. Nullprobe: ohne DNA-Matrize; Marker: SmartLadder (Eurogentec, Belgien).

3.4 *In silico*-Vorhersage der Proteinstruktur

Anhand der *in silico*-Vorhersage der Proteinstruktur sollte analysiert werden, ob die durch CRISPR/Cas9 entstandenen Insertionen und Deletionen zu einer veränderten Proteinstruktur führen. Hierzu wurde zunächst die mögliche Proteinstruktur des Alba- und des Tremula-Allels mittels der in der Tsai AspenDB (<http://aspendb.uga.edu/index.php/databases/spta-717-genome>) angegebenen Transkriptsequenz, unter Verwendung des *ExPasy Translate Webtools* (<https://web.expasy.org/translate/>), in eine Aminosäuresequenz übersetzt. Im Anschluss wurde die Proteinstruktur unter Verwendung der *SMART Protein prediction* (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?GENOMIC=1) erstellt.

3.4.1 Modifikation von *NFP-like1*

Für die unter Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) angegebene Transkriptsequenz von *P. trichocarpa* wurde mittels der o.g. *SMART*-Protein Vorhersage die in Abbildung 3.31 A angegebene Proteinstruktur ermittelt. Die Aminosäuren 1–28 bildeten das Signalpeptid, die Aminosäuren 209–231 sowie 246–286 je eine Transmembran-Region und die Aminosäuren 347–586 eine Proteinkinase. Die in der Tsai AspenDB (<http://aspendb.uga.edu/index.php/databases/spta-717-genome>) angegebenen Transkripte erzeugten für das Alba- und Tremula-Allel ähnlich aufgebaute Proteine, die sich vom *P. trichocarpa*-Protein unterschieden. Beide einte, dass sie nur eine Transmembran-Region (Aminosäure 248–270) und ein Lysin-Motiv (Aminosäure 115–162) trugen. Das Signalpeptid des Alba-Proteins hatte eine Größe von 30 Aminosäuren, während das des Tremula-Proteins 31 Aminosäuren umfasste. Die Kinase des Alba-Proteins mit den Aminosäuren 347–608 war um eine Aminosäure kürzer als die des Tremula-Proteins mit den Aminosäuren von 345–607.

3 Ergebnisse

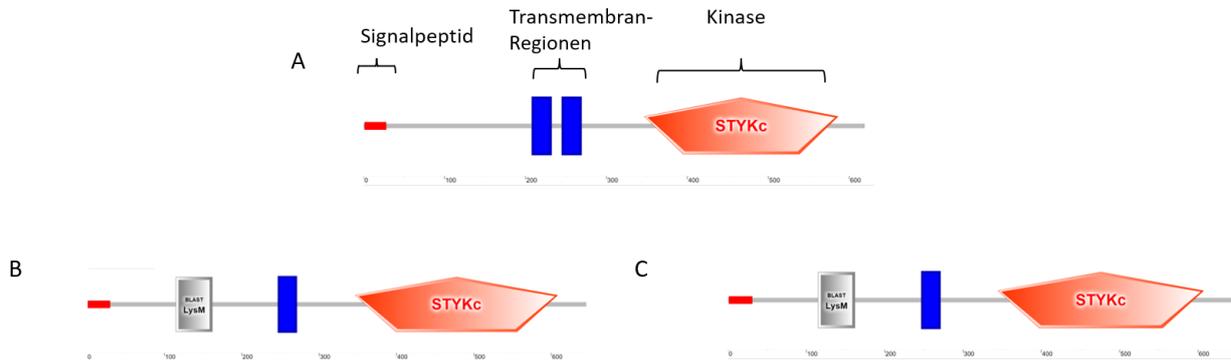


Abbildung 3.31: *In silico*-Proteinstrukturanalyse von *NFP-like1* in *P. trichocarpa* und *P. × canescens*

Proteinstruktur errechnet unter Verwendung der *SMART Protein prediction* (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?GENOMIC=1) anhand der Transkriptsequenzen von *P. trichocarpa* (Phytozome, <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!gene?search=1&detail=1&method=3252&searchText=transcriptid:27031050>, 11.05.2020) und *P. × canescens* (*P. alba* × *P. tremula*; Tsai AspenDB <http://aspenDB.uga.edu/9-uncategorised/136-gene-model-search-new-test>, 11.05.2020). Proteinmodelle wurden nach Berechnung durch die *SMART*-Software kopiert und grafisch zusammengestellt. A: *P. trichocarpa*: Aminosäure 1–28 Signalpeptid; 209–231 und 246–286 Transmembran-Region; 247–586 Kinase. B: *P. × canescens* Alba-Alell: Aminosäure 1–30 Signalpeptid; 115–162 LysM-Domäne; 248–270 Transmembran-Region; 347–608 Kinase. C: *P. × canescens* Tremula-Alell: Aminosäure 1–31 Signalpeptid; 115–162 LysM-Domäne; 248–270 Transmembran-Region; 345–607 Kinase. STYKc: Protein-Kinase.

Anhand der nachgewiesenen Modifikationen auf cDNA-Ebene konnte überprüft werden, ob sich die Veränderungen auf der gDNA-Ebene auf das Leseraster der RNA auswirken. Hierzu wurde die nachgewiesene Modifikation *in silico* in die Transkriptsequenz eingefügt und die Aminosäuresequenz unter Verwendung des *ExPASy translate Webtools* (<https://web.expasy.org/translate/>) bestimmt. In Tabelle 3.22 ist die Auswirkung der Modifikation für die ausgewählten Linien angegeben. Alle Modifikationen, die auf DNA-Ebene sowie auf cDNA-Ebene für Blatt- und Wurzelgewebe nachgewiesen werden konnten, wurden analysiert. In allen Linien, mit Ausnahme von N481-44, wurde ein vorzeitiges Stopcodon beobachtet. Alle Modifikationen einte, dass sich das Stopcodon vor der Transmembran-Region befand. Für alle Linien war außerdem die LysM-Domäne nicht funktionsfähig, da sich das Stopcodon entweder vor der LysM-Domäne befand oder ein Stopcodon bei Aminosäure 141 bzw. 142 direkt in der Domäne lokalisiert war. Die Gesamtlänge der resultierenden Proteinstruktur betrug 14,5–22,9 % des Gesamtproteins für die untersuchten Kandidatenlinien.

Tabelle 3.22: Auswirkung der durch CRISPR/Cas9 erzeugten Modifikation auf die Proteinstruktur von *NFP-like1* in den N481-Transformanten

Angegeben ist die Modifikation in *NFP-like1* in Abhängigkeit des untersuchten Allels sowie die Position des durch die Modifikation erzeugten vorzeitigen Stopcodons und die prozentuale Länge des resultierenden Proteins.

Linie	Allel	Modifikation	Vorzeitiges Stopcodon	Vollständige Protein Sequenz [%]
N481-2	Alba	Deletion A	AS 142	22,9
		Insertion A	AS 99	16,0
	Tremula	Deletion A	AS 142	22,9
N481-9	Alba	Deletion A	AS 142	22,9
	Tremula	Deletion ATTAT	AS 97	15,7
N481-15	Alba	Deletion A	AS 142	22,9
		Deletion ATAA	AS 141	22,7
	Tremula	Deletion A	AS 142	22,9
		Insertion A	AS 99	16,0
N481-23	Alba	Deletion AT	AS 98	18,8
	Tremula	Deletion A	AS 142	22,9
		Deletion ATAA	AS 141	22,8
N481-33	Alba	Insertion A	AS 99	16,0
	Tremula	Deletion A	AS 142	22,9
N481-44	Alba	Deletion TAA	Keines	100
	Tremula	Deletion A	AS 142	22,9
N481-97	Alba	Insertion 36 nt	AS 90	14,5
	Tremula	Insertion 42 nt	AS 97	15,7

3.4.2 Doppelmodifikation von *NFP-like3* und *NFP-like4*

3.4.2.1 *NFP-like3*

Zur Analyse einer Auswirkung der Modifikation auf die Proteinstruktur von *NFP-like3* wurden die Proteinstrukturen von *P. trichocarpa* und *P. × canescens* bestimmt (Abbildung 3.32). *NFP-like3* liegt in zwei Transkriptvarianten vor, wobei die längere Variante in Abbildung 3.32 A1, B1 und C1 abgebildet ist. Beim Vergleich mit den längeren Transkriptvarianten fehlte den Proteinen der kürzeren Transkriptvarianten das Signalpeptid. In den *in silico* analysierten Proteinen für das Tremula-Allel (Abbildung 3.32 C1 und C2), war keine LysM-Domäne vorhanden.

3 Ergebnisse

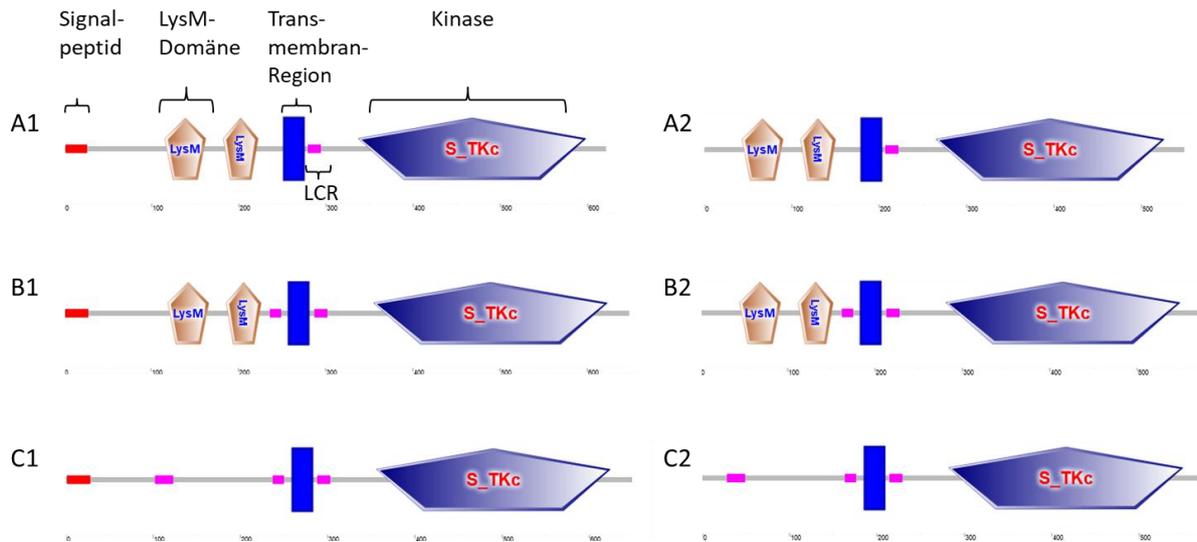


Abbildung 3.32 *In silico*-Proteinstrukturanalyse von *NFP-like3* in *P. trichocarpa* und *P. × canescens*

Proteinstruktur errechnet unter Verwendung der *SMART Protein prediction* (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?GENOMIC=1), anhand der Transkriptsequenzen von *P. trichocarpa* (Phytozome, <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!gene?search=1&detail=1&method=3252&searchText=transcriptid:27038657>; 11.05.2020) und *P. × canescens* (*P. alba* × *P. tremula*; Tsai AspenDB, <http://aspenbd.uga.edu/9-uncategorised/136-gene-model-search-new-test>; 11.05.2020). Proteinmodelle wurden nach Berechnung durch die *SMART*-Software kopiert und grafisch zusammengestellt. A1: *P. trichocarpa* Transkriptvariante 1: Aminosäure 1–26 Signalpeptid; 115–162 und 182–222 LysM Domäne; 252–274 Transmembran-Region; 279–294 *low complexity region*; 337–598 Kinase. A2: *P. trichocarpa* Transkriptvariante 2: Aminosäure 43–90 und 110–150 LysM Domäne; 180–202 Transmembran-Region; 207–222 *low complexity region*; 265–536 Kinase. B1: *P. × canescens* Alba-Allel Transkriptvariante 1: Aminosäure 1–28 Signalpeptid; 119–166 und 186–226 LysM-Domäne; 236–249 und 287–302 *low complexity region*, 258–280 Transmembran-Region, 355–623 Kinase., B2: *P. × canescens* Alba-Allel Transkriptvariante 2: Aminosäure 45–92 und 112–152 LysM-Domäne; 162–175 und 213–228 *low complexity region*; 184–206 Transmembran-Region; 281–549 Kinase. C1: *P. × canescens* Tremula-Allel Transkriptvariante 1: Aminosäure 1–28 Signalpeptid; 102–123, 237–250 und 288–303 *low complexity region*; 260–282 Transmembran-Region; 356–624 Kinase. C2: *P. × canescens* Tremula-Allel Transkriptvariante 2: Aminosäure 28–48, 163–176 und 214–229 *low complexity region*; 186–208 Transmembran-Region; 282–550 Kinase. LCR: *low complexity region*. S_TRc: Serin/ Threonin Protein-Kinase.

Anhand der nachgewiesenen Modifikationen auf cDNA-Ebene konnte überprüft werden, ob sich die Veränderungen auf das Leseraster auswirken. Hierzu wurde die nachgewiesene Modifikation *in silico* in die Transkriptsequenz eingefügt. Danach wurde die Aminosäuresequenz unter Verwendung des *ExPASy translate Webtools* (<https://web.expasy.org/translate/>) bestimmt. Alle beobachteten Modifikationen auf DNA-Ebene und cDNA-Ebene für Blatt- und Wurzelgewebe wurden analysiert. Bei der Analyse der möglichen Proteine mussten alle nachgewiesenen Modifikationen für beide Allele getestet werden, da bei einer heterozygot biallelischen oder monoallelischen Modifikation nicht bestimmt wurde, um welches Allel es sich handelte. Bei einer Modifikation in beiden gRNA-Targets mussten alle Kombinationsmöglichkeiten getestet werden, um alle möglichen

3 Ergebnisse

resultierenden Proteine zu ermitteln. Weiterhin musste diese Analyse für die zwei vorliegenden Transkriptvarianten durchgeführt werden. Für die heterozygote Linie N482-24 ergaben sich für beide Allele insgesamt 7 unterschiedliche Kombinationsmöglichkeiten, die im Anhang in Tabelle 6.3 aufgeführt sind. Zusammenfassend zeigte sich für N482-24, dass Einzelintegrationen eines Adenins oder Thymins für das gRNA3-Target und Einzelintegrationen eines Adenins oder Doppelintegrationen von zwei Thymin-Basen für die Transkriptvariante 1 zwar zu einem vorzeitigen Stopcodon auf dem eigentlichen Leseraster führten, jedoch ein Protein ohne Signalpeptid auf einem anderen Leseraster erzeugt werden konnte. Weiterhin resultierten Einzelintegrationen im gRNA3- und gRNA4-Target in einem vorzeitigen Stopcodon ohne eine mögliche Synthese des Proteins auf einem anderen Leseraster. Allerdings konnte bei der Kombination einer Doppelintegration von zwei Thymin-Basen im gRNA3-Target und einer Einzelintegration eines Adenins im gRNA4-Target zu einem funktionsfähigen Protein für die Transkriptvariante 1 führen, dass um eine Aminosäure länger war als das ursprüngliche Protein. Auf Grund der vielen Synthetisierungsmöglichkeiten des *NFP-like3*-Proteins in der Linie N482-24, wurde diese Linie für die weiteren Analysen verworfen.

Für die Linie N482-47 sind die Ergebnisse in Tabelle 3.23 angegeben. Es zeigte sich, dass trotz einer Insertion von 88 Nukleotiden im Alba-Allel, ein Protein auf einem anderen Leseraster erzeugt werden konnte. Das Protein, das auf einem anderen Leseraster für die Transkriptvariante 1 entstehen könnte, ist 72 Aminosäuren kürzer als die originale Variante. Die Transkriptvariante 2 zeigte sogar die identische Länge zur nicht-modifizierten Variante. In beiden Fällen wurde ein Protein ohne ein Signalpeptid erzeugt. Für die Modifikationen auf dem Tremula-Allel wurde ein vorzeitiges Stopcodon für die Transkriptvariante 1 erzeugt. Das Stopcodon lag bei 10 % der resultierenden Proteinstruktur, bei der Transkriptvariante 2 wurde durch die Modifikationen auf dem Tremula-Allel kein Protein erzeugt.

Tabelle 3.23: Auswirkung der durch CRISPR/Cas9 erzeugten Modifikation auf die Proteinstruktur von *NFP-like3* in N482-47

Dargestellt sind die Modifikationen für beide Allele der Linie N482-47. g3: gRNA3-Target; g4: gRNA4-Target; AS: Aminosäure; nt: Nukleotide; GP: Gesamtprotein; Vorzeitiges Stopcodon: Stopcodon auf dem eigentlichen Leseraster des Proteins; grün: Transkriptvariante 1; ohne Färbung: Transkriptvariante 2.

Linie	Modifikation	Anmerkung
N482-47	Alba g3: Insertion 88 nt g4: Wt	Stopcodon bei AS 93 \cong 15 % des GP Verkürzte Version mit 550 AS auf einem anderen Leseraster erzeugt ein Protein ohne Signalpeptid \cong 88,4 % des GP auf dem Alba-Allel.
	Tremula g3: Insertion T g4: Insertion C	Stopcodon bei AS 64 \cong 10,3 % des GP auf dem Tremula-Allel.
	Alba g3: Insertion 88 nt g4: Wt	Startcodon fehlt. Startcodon auf einem anderen Leseraster erzeugt ein vollständiges Protein mit 550 AS
	Tremula g3: Insertion T g4: Insertion C	Kein Startcodon vorhanden

3.4.2.2 *NFP-like4*

Die Analyse zur Proteinstruktur für *NFP-like4* wurde gleichermaßen durchgeführt wie für *NFP-like3*. Hierzu wurden die Proteinstrukturen für *P. trichocarpa* und für beide Allele der *P. × canescens in silico* mithilfe der *SMART Protein prediction* (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?GENOMIC=1) analysiert. Beide Allele von *P. × canescens* (Abbildung 3.33 B und C) kodieren für ein Protein, das ein Signalpeptid, zwei LysM-Domänen, eine Transmembran-Domäne und eine Kinase aufwies.

3 Ergebnisse

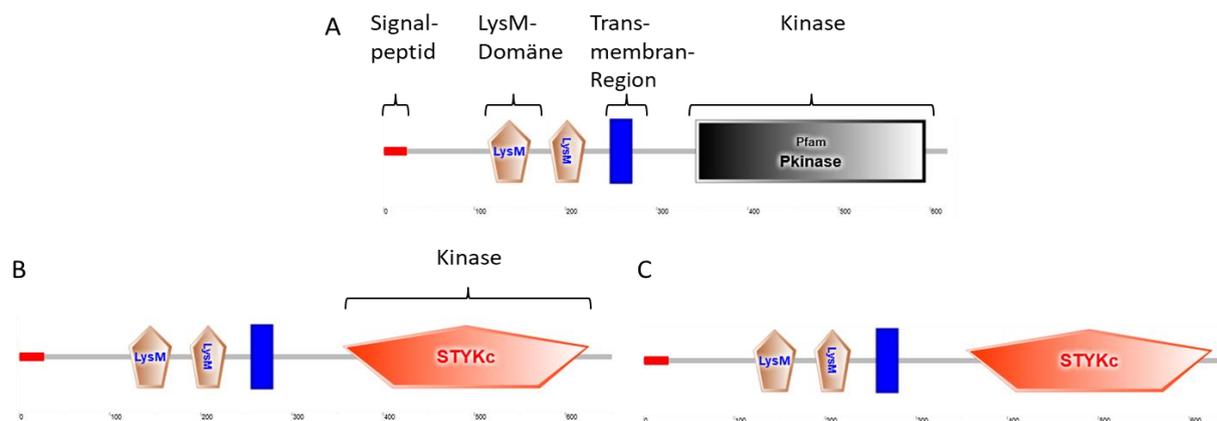


Abbildung 3.33: In silico-Proteinstrukturanalyse von *NFP-like4* in *P. trichocarpa* und *P. x canescens*

Proteinstruktur errechnet unter zu Verwendung der *SMART Protein prediction* (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?GENOMIC=1), anhand der Transkriptsequenzen von *P. trichocarpa* (Phytozome, <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!gene?search=1&detail=1&method=3252&searchText=transcriptid:26978908>; 11.05.2020) und *P. x canescens* (*P. alba* × *P. tremula*, Tsai AspenDB <http://aspensdb.uga.edu/9-uncategorised/136-gene-model-search-new-test>; 11.05.2020). Proteinmodelle wurden nach Berechnung durch die *SMART-Software* kopiert und grafisch zusammengestellt. A: *P. trichocarpa*: Aminosäure 1–26 Signalpeptid; 115–162 und 182–222 LysM-Domäne; 250–272 Transmembran-Region; 343–595 Kinase. B: *P. x canescens* Alba-Allel: Aminosäure 1–28 Signalpeptid; 121–168 und 188–228 LysM-Domäne; 256–278 Transmembran-Region; 356–626 Kinase. C: *P. x canescens* Tremula-Allel: Aminosäure 1–28 Signalpeptid; 121–168 und 188–228 LysM-Domäne; 257–279 Transmembran-Region; 355–625 Kinase. STYKc: Protein-Kinase; Pkinase: Protein-Kinase.

Anhand der beobachteten Modifikation für *NFP-like4* wurden die möglichen Auswirkungen auf das resultierende Protein untersucht (Tabelle 3.24). Für die Linie N482-24 konnte beobachtet werden, dass eine Deletion von drei Nukleotiden sich auf die Länge des resultierenden Proteins dahingehend auswirkt, dass es um eine Aminosäure kürzer war. Die Analyse mit der *SMART Protein prediction* (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?GENOMIC=1) ergab, dass die Domänen des modifizierten und nicht-modifizierten Proteins identisch waren. Die Insertion eines Thymins im Tremula- und Alba-Allel war für die Linien N482-24 und N482-47 identisch und erzeugte für beide Allele ein verkürztes Protein ohne Signalpeptid.

Tabelle 3.24: Auswirkung der durch CRISPR/Cas9 erzeugten Modifikation auf die Proteinstruktur von *NFP-like4* in N482-Transformanten

Angegeben sind die nachgewiesenen Modifikationen und deren möglichen Auswirkungen auf die Peptidsequenz. AS: Aminosäure; GP: Gesamtprotein; g3: gRNA3-Target; g4: gRNA4-Target; Wildtyp: in der Sequenzanalyse genetisch identisch zum Kontroll-Klon P1.

Linie	Modifikation	Anmerkung
N482-24	g3: Deletion AGC g4: Wildtyp	Kein vorzeitiges Stopcodon, das Protein ist um eine AS kürzer und hat eine zusätzliche AS mit <i>low complexity region</i> .
	g3: Insertion T g4: Wildtyp	Erzeugt Stopcodon bei AS 64 \cong 10,3 % des GP Alba: Verkürzte Version mit 573 AS auf einem anderen Leseraster erzeugt ein Protein ohne Signalpeptid \cong 92,6 % des GP Tremula: Verkürzte Version mit 548 AS auf einem anderen Leseraster erzeugt Protein ohne Signalpeptid \cong 88,4 % des GP
N482-47	g3: Insertion T g4: Wildtyp	Erzeugt Stopcodon bei AS 64 \cong 10,3 % des GP Verkürzte Version mit 573 AS auf einem anderen Leseraster erzeugt Protein ohne Signalpeptid \cong 92,6 % des GP

3.4.3 Dreifachmodifikation von *NFP-like1*, *NFP-like3* und *NFP-like4*

Wie bereits in 3.4.1 und 3.4.2 beschrieben wurden die resultierenden genetischen Modifikationen auf eine mögliche Proteinstruktur *in silico* analysiert. Diese Analyse wird im Folgenden für die Kandidatenlinien zur Modifikation aller Kandidatengene dargestellt.

Die Modifikation von *NFP-like1* war für alle Linien identisch und hatte ein vorzeitiges Stopcodon bei Aminosäure 142 zur Folge. Das resultierende Protein hatte eine Länge von 22,9 % der Gesamtlänge des vollständigen Proteins.

In Tabelle 3.25 sind die Auswirkungen der Modifikation auf cDNA-Ebene von *NFP-like3* auf ein mögliches resultierendes Protein angegeben. Die cDNA-Analysen erfolgten auf Grundlage von isolierter RNA aus Blatt- und Wurzelgewebe, mit unterschiedlichen Modifikationsergebnissen, sodass alle möglichen Modifikationskombinationen untersucht wurden. Für das Tremula-Allel von N483-8 lagen zwei Versionen vor. Die *in silico*-Analyse von N483-8 ergab für die Transkriptvariante 1, für alle nachgewiesenen Modifikationen, ein vorzeitiges Stopcodon bei Aminosäure 64. Das resultierende Protein entsprach einer Länge von 10,3 % des Gesamtproteins. Zusätzlich zu dem gewöhnlichen Leseraster, konnte auf einem anderen Leseraster lediglich die Kinase-Domäne des Proteins erzeugt werden. Die Transkriptvariante 2 von N483-8 zeigte auf Grund der Modifikation auf dem normalen Leseraster kein Startcodon, sodass dieses Protein nicht erzeugt wird. Auf einem anderen Leseraster war, wie bei der Transkriptvariante 1, lediglich die Erzeugung der Kinase-Domäne möglich. Eine ähnliche Auswirkung der durch CRISPR/Cas9 erzeugten Modifikationen wurde für die Linie N484-3 nachgewiesen. In der Transkriptvariante 1 wurde ebenfalls ein vorzeitiges Stopcodon, in der Transkriptvariante 2 kein Startcodon erzeugt. Alle

3 Ergebnisse

Modifikationen erzeugten lediglich die Kinase-Domäne auf einem anderen Leseraster. Anders waren die Modifikationen von N484-6 zu werten. In der Transkriptvariante 1 wurden zwar vorzeitige Stopcodonen erzeugt, in anderen Leserastern waren jedoch große Teilstücke des Proteins, denen das Signalpeptid fehlte, synthetisierbar. Die Modifikation in der Transkriptvariante 2 bedingte für das Alba-Allel ein vorzeitiges Startcodon. Das resultierende Protein war länger als die ursprüngliche Variante, wies jedoch kein Signalpeptid auf. Die möglichen Modifikationen des Tremula-Allels hatten zur Folge, dass auf dem ursprünglichen Leseraster kein Startcodon erzeugt wurde. Längere Versionen des Proteins ohne das Signalpeptid waren auf einem anderen Leseraster möglich.

Zusammenfassend konnte anhand der *in silico*-Analyse die Linie N484-6 für weitere Versuche ausgeschlossen werden, wohingegen N483-8 und N484-3 vielversprechende Kandidatenlinien waren.

Tabelle 3.25: Auswirkung der durch CRISPR/Cas9 erzeugten Modifikation auf die Proteinstruktur von *NFP-like3* der Kandidatenlinien der Dreifachmodifikation

Modifikationen für beide Allele der Linien N483-8, N484-3 und N484-6. g3: gRNA3-Target; g4: gRNA4-Target; AS: Aminosäure; GP: Gesamtprotein; Vorzeitiges Stopcodon: Stopcodon auf dem eigentlichen Leseraster des Proteins; grün: Transkriptvariante 1; ohne Färbung: Transkriptvariante 2; Wildtyp: in der Sequenzanalyse genetisch identisch zum Kontroll-Klon P1.

Linie	Modifikation <i>NFP-like3</i>	Anmerkung
N483-8	Alba <u>g3</u> : Insertion A <u>g4</u> : Deletion 74 nt <u>oder</u> Tremula (1) Tremula (2) <u>g3</u> : Insertion T <u>g3</u> : Insertion G <u>g4</u> : Insertion T <u>g4</u> : Insertion T	Stopcodon bei AS 64 $\hat{=}$ 10,3 % des GP Verkürzte Version mit 326 AS auf einem anderen Leseraster erzeugt nur die Kinase: Alba $\hat{=}$ 52,4 % des GP Tremula $\hat{=}$ 52,3 % des GP
	Alba <u>g3</u> : Insertion A <u>g4</u> : Deletion 74 nt <u>oder</u> Tremula (1) Tremula (2) <u>g3</u> : Insertion T <u>g3</u> : Insertion G <u>g4</u> : Insertion T <u>g4</u> : Insertion T	Startcodon fehlt. Verkürzte Version mit 326 AS, auf einem anderen Leseraster erzeugt nur die Kinase Alba $\hat{=}$ 59,3 % des GP Tremula $\hat{=}$ 59,2 % des GP

3 Ergebnisse

Fortsetzung Tabelle 3.25

N484-3	Alba <u>g3</u> : Insertion A <u>g4</u> : Insertion A	Tremula <u>g3</u> : Insertion T <u>g4</u> : Deletion 52 nt	Stopcodon bei AS 64 \triangleq 10,3 % des GP. Verkürzte Version mit 326 AS auf einem anderen Leseraster erzeugt nur die Kinase: Alba \triangleq 52,4 % des GP Tremula \triangleq 52,3 % des GP
	Tremula <u>g3</u> : Insertion TT <u>g4</u> : Deletion 52 nt		Stopcodon bei AS 89 \triangleq 14,3 % des GP. Verkürzte Version mit 326 AS auf einem anderen Leseraster erzeugt nur die Kinase \triangleq 52,4 % des GP
	Alba <u>g3</u> : Insertion A <u>g4</u> : Insertion A <u>oder</u> Tremula (1) <u>g3</u> : Insertion T <u>g4</u> : Deletion 52 nt	Tremula (2) <u>g3</u> : Insertion TT <u>g4</u> : Deletion 52 nt	Startcodon fehlt. Verkürzte Version mit 326 AS, auf einem anderen Leseraster erzeugt nur die Kinase Alba \triangleq 59,3 % des GP Tremula \triangleq 59,2 % des GP
N484-6	Alba <u>g3</u> : Insertion A <u>g4</u> : Wildtyp		Stopcodon bei AS 64 \triangleq 10,3 % des GP. Verkürzte Version mit 576 AS auf einem anderen Leseraster erzeugt Protein ohne Signalpeptid \triangleq 92,6 % des GP
	Tremula <u>g3</u> : Deletion ACCGA <u>g4</u> : Wildtyp		Stopcodon bei AS 67 \triangleq 10,8 % des GP. Verkürzte Version mit 575 AS auf einem anderen Leseraster erzeugt Protein ohne Signalpeptid \triangleq 92,3 % des GP
	Tremula <u>g3</u> : Deletion CCGA <u>g4</u> : Wildtyp		Stopcodon bei AS 71 \triangleq 11,4 % des GP Verkürzte Version mit 551 AS auf einem anderen Leseraster erzeugt Protein ohne Signalpeptid \triangleq 88,4 % des GP
	Alba <u>g3</u> : Insertion A <u>g4</u> : Wildtyp		Vorzeitiges Startcodon, erzeugt ein Protein mit einer Gesamtlänge von 576 AS. Längere Version der Transkript-Version 2 ohne Signalpeptid
	Tremula <u>g3</u> : Deletion ACCGA <u>g4</u> : Wildtyp		Startcodon fehlt. Längere Version des Proteins mit 575 AS ohne Signalpeptid auf einem anderen Leseraster
	Tremula <u>g3</u> : Deletion CCGA <u>g4</u> : Wildtyp		Startcodon fehlt Längere Version des Proteins mit 551 AS ohne Signalpeptid auf einem anderen Leseraster

In Tabelle 3.26 sind die möglichen Auswirkungen der durch CRISPR/Cas9 erzeugten Modifikation in *NFP-like4* der Linien N483-8, N484-3 und N484-6 dargestellt. Jede Modifikation erzeugte ein vorzeitiges Stopcodon bei Aminosäure 64, das ein Protein von einer prozentualen Länge von 10,3 % des Gesamtproteins zur Folge hatte. Jedoch waren für alle Modifikationen mögliche Proteine über ein anderes Leseraster erzeugbar. Jedem der möglichen Proteine fehlte jedoch das Signalpeptid, das bei dem ursprünglichen Protein vorhanden war. Die verkürzten Proteine ohne Signalpeptid hatten eine Länge von 88,3–92,3 % des ursprünglichen Proteins.

3 Ergebnisse

Tabelle 3.26: Auswirkung der durch CRISPR/Cas9 erzeugten Modifikation auf die Proteinstruktur von *NFP-like4* in drei Kandidatenlinien der Dreifachmodifikation

Dargestellt sind Modifikationen für beide Allele der Kandidatenlinien N483-8, N484-3 und N484-6. g3: gRNA3-Target; g4: gRNA4-Target; AS: Aminosäure; GP: Gesamtprotein; Vorzeitiges Stopcodon: Stopcodon auf dem eigentlichen Leseraster des Proteins; Wildtyp: in der Sequenzanalyse genetisch identisch zum Kontroll-Klon P1.

Linie	Modifikation <i>NFP-like4</i>	Anmerkung
N483-8	g3: Insertion T g4: Wildtyp	Stopcodon bei AS 64 \triangleq 10,3 % des GP. Alba: Verkürzte Version mit 573 AS auf einem anderen Leseraster erzeugt Protein ohne Signalpeptid \triangleq 92,6 % des GP Tremula: Verkürzte Version mit 548 AS auf einem anderen Frame erzeugt Protein ohne Signalpeptid \triangleq 88,4 % des GP
	g3: Insertion T g4: Deletion ATAAGG	Stopcodon bei AS 64 \triangleq 10,3 % des GP. Alba: Verkürzte Version mit 571 AS auf einem anderen Leseraster erzeugt Protein ohne Signalpeptid \triangleq 92,2 % des GP Tremula: Verkürzte Version mit 517 AS auf einem anderen Leseraster erzeugt Protein ohne Signalpeptid \triangleq 83,4 % des GP
N484-3	g3: Insertion T g4: Wildtyp	Stopcodon bei AS 64 \triangleq 10,3 % des GP. Alba: Verkürzte Version mit 573 AS auf einem anderen Leseraster erzeugt Protein ohne Signalpeptid \triangleq 92,6 % des GP Tremula: Verkürzte Version mit 548 AS auf einem anderen Leseraster erzeugt Protein ohne Signalpeptid \triangleq 88,4 % des GP
	g3: Insertion T g4: Deletion CATAAGG	Stopcodon bei AS 64 \triangleq 10,3 % des GP. Alba: Verkürzte Version mit 571 AS auf einem anderen Leseraster erzeugt Protein ohne Signalpeptid \triangleq 92,2 % des GP Tremula: Verkürzte Version mit 517 AS auf einem anderen Leseraster erzeugt Protein ohne Signalpeptid \triangleq 83,4 % des GP
N484-6	g3: Insertion T g4: Wildtyp	Stopcodon bei AS 64 \triangleq 10,3 % des GP. Alba: Verkürzte Version mit 573 AS auf einem anderen Leseraster erzeugt Protein ohne Signalpeptid \triangleq 92,6 % des GP Tremula: Verkürzte Version mit 548 AS auf einem anderen Leseraster erzeugt Protein ohne Signalpeptid \triangleq 88,3 % des GP
	g3: Insertion T g4: Insertion C	Stopcodon bei AS 64 \triangleq 10,3 % des GP. Alba: Verkürzte Version mit 516 AS auf einem anderen Leseraster erzeugt Protein ohne Signalpeptid \triangleq 83,4 % des GP Tremula: Verkürzte Version mit 517 AS auf einem anderen Leseraster erzeugt Protein ohne Signalpeptid \triangleq 83,4 % des GP

3.5 Mykorrhizierungsversuche

3.5.1. Analyse des Mykorrhizierungsverhaltens in *NFP-like* modifizierten Pappellinien

Zur Analyse einer veränderten Mykorrhizierung durch die Modifikation der Kandidatengene wurden zwei vielversprechende Kandidatenlinien für einen Mykorrhizierungsversuch in Erde ausgewählt. Die Kandidatenlinien und der nicht-transformierte Kontroll-Klon P1 wurden in autoklavierter Erde angezogen und nach einem Wachstum von 15 Tagen in ihre Endtöpfe mit einem Durchmesser von 19 cm im Gewächshaus überführt.

Die Hälfte der Pflanzen wurde mit dem INOQ Forst Mykorrhiza-Substrat (INOQ GmbH, Schnega, Deutschland) beimpft, die andere Hälfte wuchs ohne Mykorrhizagabe. In dem verwendeten Mykorrhiza-Substrat waren nach Herstellerangaben die endomykorrhizierenden Pilze *Rhizoglyphus irregularis*, *Funneliformis mosseae* und *Funneliformis caledonium* enthalten, ebenso folgende vier Ektomykorrhiza-Pilze: *Amanita muscaria*, *Hebeloma crustuliniforme*, *Cenococcum geophilum* und *Pisolithus arhizus*. Zum Nachweis der genannten ektomykorrhizierenden Pilze wurden die Wurzeln der Linien P1, N481-97 und N483-8 visuell untersucht. Über einen Zeitraum von sechs Monaten erfolgte das Wachstum der Pflanzen im Gewächshaus unter kontrollierten Bedingungen, wobei auf eine zusätzliche Düngung der Pflanzen verzichtet wurde. Zur Vermeidung von Positionseffekten wurden die Pflanzen randomisiert aufgestellt. Die Höhe der Pflanzen wurde einmalig im Monat bestimmt und nach einer Wachstumsphase von sechs Monaten erfolgte die Abschlussmessung. Folgende phänotypische Merkmale wurden hierbei untersucht: Höhe, Durchmesser, Anzahl der Blätter sowie Frisch- und Trockengewicht.

3.5.2 Phänotypische Analyse

Um eine Veränderung im Mykorrhizierungsverhalten von N481-97 und N483-8 zu analysieren, wurden die Pflanzen, wie in 2.12 beschrieben, angezogen und behandelt. Die Auswertung der erhobenen Daten zur phänotypischen Analyse zeigte für die Höhe, Durchmesser und die Anzahl der Blätter keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit Mykorrhiza-Substrat inokulierten und den nicht-inokulierten Pflanzen einer Linie. Das Frischgewicht und Trockengewicht war für die transgenen Linien N481-97 und N483-8 beim Vergleich der inokulierten, mit den nicht-inokulierten Pflanzen in den nicht-inokulierten Linien signifikant höher als in den nicht-inokulierten Linien (Abbildung 3.35). Für P1 konnte kein Unterschied im Frisch- und Trockengewicht in den inokulierten Linien zu den nicht-inokulierten Linien nachgewiesen werden. Weiterhin konnte kein signifikanter Unterschied

3 Ergebnisse

zwischen dem Frisch- und Trockengewicht der inokulierten Linien und den nicht-inokulierten Linien der *NFP-like* modifizierten Pflanzen und dem nicht-transgenen Kontroll-Klon P1 beobachtet werden. In Abbildung 3.35 sind die erhobenen Daten der Höhe, Durchmesser, Anzahl der Blätter, Frisch- und Trockengewicht zur Abschlussmessung dargestellt. Eine Verteilung der Daten ist im Anhang in Abbildung 6.5 als Boxplots dargestellt.

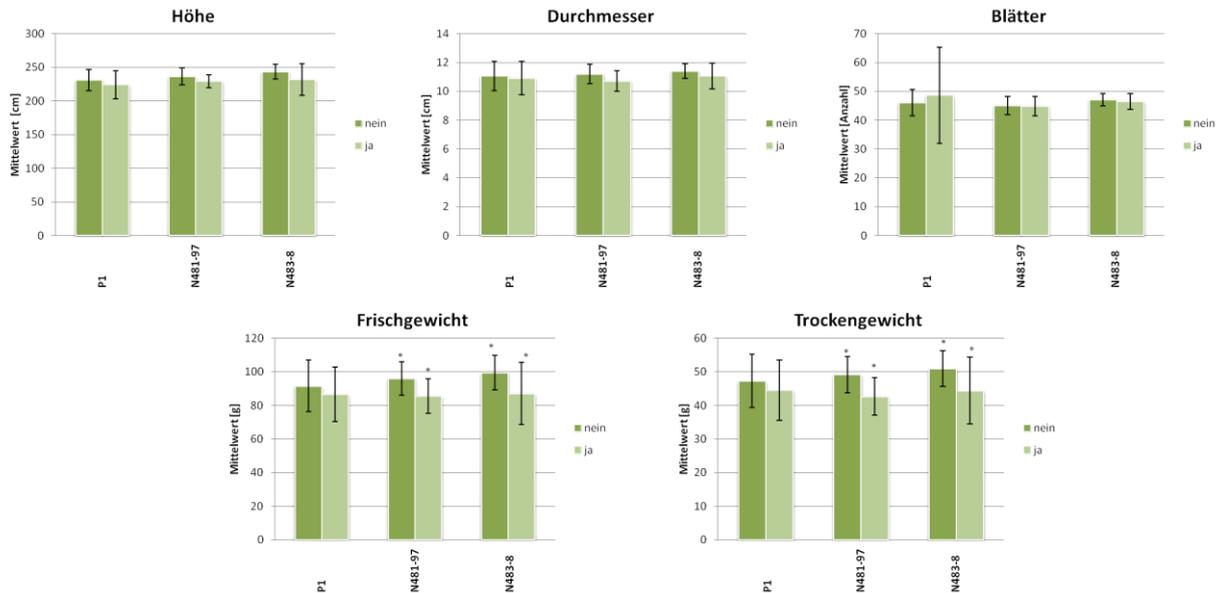


Abbildung 3.34: Phänotypische Analyse des Mykorrhizierungsversuches mit den in *NFP-like* modifizierten transgenen Pappellinien und dem Kontroll-Klon P1

Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung (SD) als vertikale Linien zu den erhobenen Daten der Höhe, Durchmesser, Anzahl der Blätter sowie Frisch- und Trockengewicht nach einer Wachstumsphase von sechs Monaten unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus. Nein: nicht-inokuliert; Ja: inokuliert; P1: nicht-transgene Kontrolle; N481-97: *NFP-like1* modifiziert; N483-8: *NFP-like1*, *NFP-like3* und *NFP-like4* modifiziert. Signifikante Unterschiede zwischen inokulierten und nicht-inokulierten Pflanzen der gleichen Linie sind mit einem schwarzen Stern gekennzeichnet.

Neben der phänotypischen Analyse der Pflanzen, wurden die Wurzeln auf das Vorhandensein von Mykorrhiza-Strukturen untersucht. Bei der Untersuchung des Wurzelballens wurde zunächst der Durchwurzelungsgrad aller Pflanzen bestimmt, bei dem jedoch keine Unterschiede beobachtet werden konnten.

3.5.3 Mikroskopische Analyse von Wurzelspitzen

Zum Nachweis einer möglichen Mykorrhizierung wurden die Wurzeln der im Mykorrhizierungsversuch kultivierten Pflanzen binokularisch analysiert. Dazu wurde ein Teil des Wurzelsystems entnommen und unter Leitungswasser von überschüssiger Erde befreit (Abbildung 3.35).

In allen untersuchten Wurzeln wurden ähnliche Strukturen beobachtet, unabhängig davon, ob die Pflanze mit dem Mykorrhiza-Substrat inokuliert war oder nicht. Die Abbildung 3.35 zeigt die beobachteten Strukturen an inokulierten und nicht-inokulierten Pflanzen. In Abbildung 3.35 C sind Wurzelspitzen zu erkennen, die Wurzelhaare aufwiesen, sodass keine Mykorrhizierung vorhanden war. Eine Mykorrhizierung geht mit dem Verlust der Wurzelhaare einher (persönliche Mitteilung Dr. Ben Bubner, Thünen-Institut für Forstgenetik, Waldsiedersdorf, Deutschland). Mykorrhizen an den Wurzeln äußern sich in mantelartigen Strukturen, wie sie in den Abbildungen 3.35 A und B zu erkennen sind. Ein weiteres Merkmal von Mykorrhizen ist, dass sie sich in Clustern an den Wurzeln ausbilden (persönliche Mitteilung Dr. Ben Bubner, Thünen-Institut für Forstgenetik, Waldsiedersdorf, Deutschland). Die Wurzelanalyse ergab, dass mutmaßlich zwei bis drei verschiedene Mykorrhiza-Stämme vorhanden waren. Am häufigsten tritt die wie in Abbildung 3.35 A für P1 + Myk dargestellte Mykorrhizierung auf, die in allen untersuchten Proben nachgewiesen wurde.

Zusammenfassend zeigte die morphologische Untersuchung der Pappelwurzeln, dass Mykorrhizen an allen Wurzeln, ob mit dem INOQ Forst Mykorrhiza-Substrat (INOQ GmbH, Schnega, Deutschland) inokuliert oder nicht inokuliert, vorhanden waren.

3 Ergebnisse

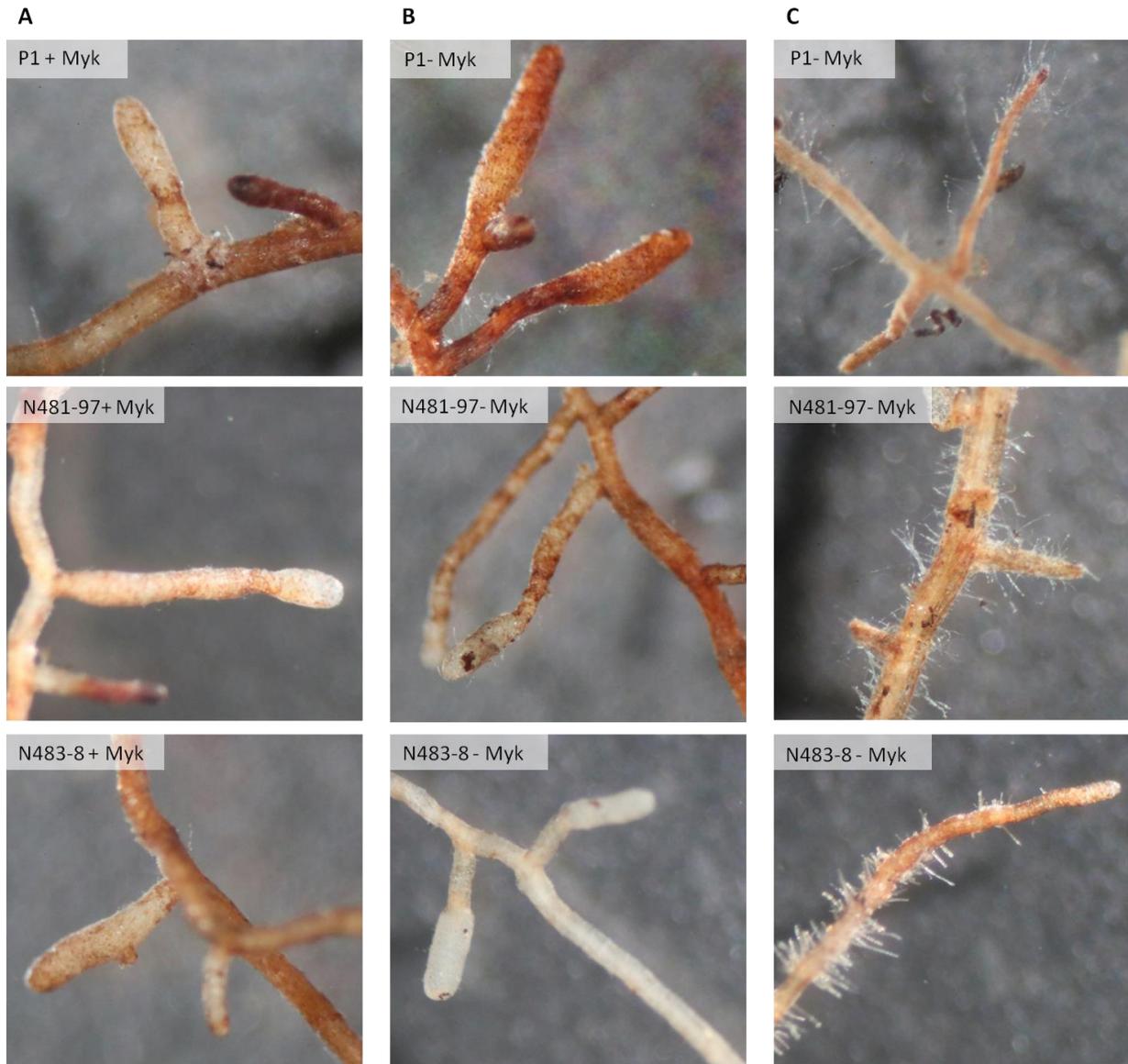


Abbildung 3.35: Mykorrhizierte und nicht-mykorrhizierte Wurzelspitzen bei zwei *NFP-like* modifizierten Linien und dem Kontroll-Klon P1

Fotografische Aufnahmen von Wurzelspitzen der Linien P1, N481-97 und N483-8 mit und ohne Mykorrhiza-Substrat. A: Mykorrhizen an inokulierten Linien; B: Mykorrhizen an nicht-inokulierten Linien; C: Wurzelspitzen ohne Mykorrhizen; + Myk: Inokuliert mit Mykorrhiza-Substrat; - Myk: ohne Inokulum. 80-fache Vergrößerung.

3.5.4 Molekulare Untersuchungen von Wurzelmaterial

Um nachzuweisen, ob es sich bei den wurzellozierten Strukturen um Mykorrhizen handelte, wurde aus entsprechenden Wurzelspitzen DNA isoliert. Anschließend wurde in PCR-Reaktionen mit den Oligonukleotiden #2233 und #2234 die ITS amplifiziert und sequenziert. Für die DNA-Analysen wurden Wurzelspitzen von Pflanzen gewählt, die mit dem Mykorrhiza-Substrat (INOQ Forst Mykorrhiza Substrat, INOQ GmbH, Schnega, Deutschland) angeimpft waren und Wurzeln ohne Substratimpfung. Es wurden fünf Linien

3 Ergebnisse

mit Substrat und fünf Linien ohne Substrat für die Analysen verwendet. In zahlreichen Proben konnte nach DNA-Isolation und ITS-PCR kein Fragment erzeugt werden (Abbildung 3.36). Die DNA-Isolation und ITS-Amplifikation wurden mehrfach für unterschiedliche Linien durchgeführt. Teilweise waren Doppelbanden nach der Auftrennung im Agarosegel vorhanden, sodass nicht eine einzelne Art amplifiziert wurde, sondern mutmaßlich zwei. Die Sequenzanalyse der Doppelbanden führte zu überlagerten Sequenzen, die keiner Art zugeordnet werden konnten.

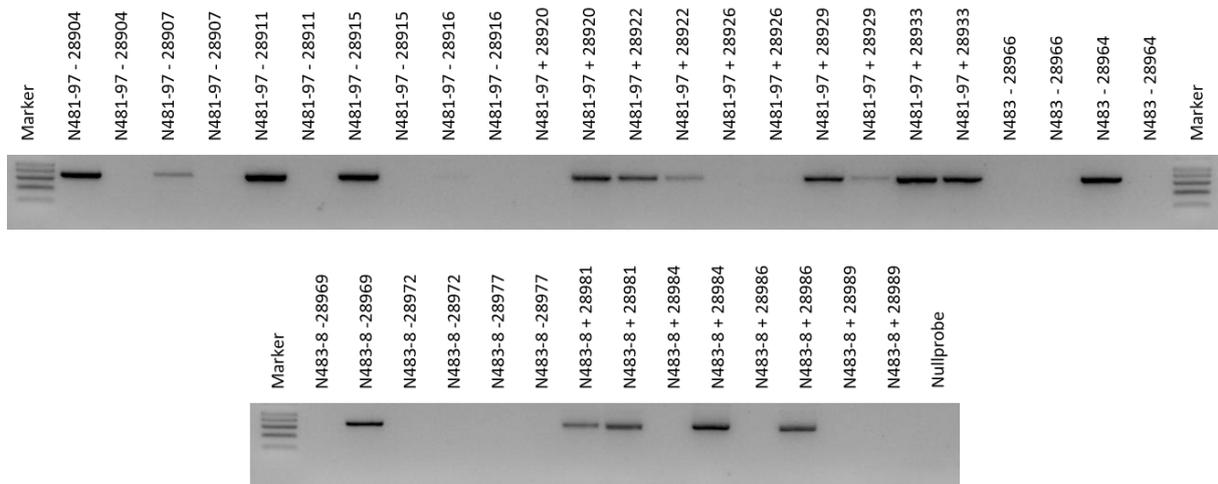


Abbildung 3.36: ITS-Amplifikation von Wurzelspitzen zum Nachweis möglicher Mykorrhizen
Agarosegelbilder nach ITS-Amplifikation mit den Oligonukleotiden #2233 und #2234, je Pflanze wurden zwei Proben entnommen und zur DNA-Isolation verwendet. -: ohne Mykorrhiza-Substrat, +: mit Mykorrhiza-Substrat, Nullprobe: ohne DNA-Matrize, Marker: SmartLadder (Eurogentec, Belgien).

In Tabelle 3.27 sind ausschließlich die Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung für die Einzelbanden in Abhängigkeit von der verwendeten transgenen Linie oder dem Kontroll-Klon P1 und der Inokulation angegeben. Die Auswertung der Sequenzerggebnisse ergab, dass Wurzelspitzen von 13 Linien mit *Tomentella ellisii* oder *Tomentella spec.* besiedelt waren. Bei drei Wurzelspitzen konnte ein nicht-kultivierter Pilz (*Blast*-Ergebnis bei *NCBI* <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ohne Artnamen nachgewiesen werden. Sequenzen der im Mykorrhiza-Substrat enthaltenen Mykorrhizen konnten in den gewählten Wurzeln, die mutmaßlich mit mykorrhizierenden Pilzen assoziiert waren, nicht gefunden werden. Weiterhin zeigte die Sequenzanalyse, dass die mit Mykorrhizen assoziierten Wurzeln in den inokulierten und nicht-inokulierten Linien die gleichen Pilze aufwiesen. Zusammenfassend wurde bei der binokularischen Analyse an allen Pflanzen mit oder ohne Mykorrhizagabe, mykorrhizierende Strukturen an den Wurzeln beobachtet.

3 Ergebnisse

Tabelle 3.27: Sequenzierungsergebnisse der ITS-Amplifikation von mutmaßlich mit mykorrhizierten Pilzen assoziierten Wurzelspitzen

Angegeben ist der Klon/die transgene Linie, die zur ITS-Analyse der Mykorrhizen an den Wurzelspitzen verwendet wurde sowie die Gabe von Mykorrhiza-Substrat. Gelistet ist das *Blast*-Ergebnis mit der höchsten Übereinstimmung zu dem jeweiligen sequenzierten Amplikon mit der *Accession Number* in *NCBI* und der zugehörigen Art.

Linie	Pflanzen Nummer	Mykorrhiza-Substrat	Sequenzauswertung	Accession Number NCBI
P1	29008	Nein	<i>Tomentella ellisii clone</i>	DQ068971.1
	29003	Nein	<i>Tomentella ellisii clone</i>	DQ068971.1
	29011	Nein	<i>uncultured fungus clone</i>	KF617886.1
	29014	Nein	<i>Tomentella ellisii clone</i>	DQ068971.1
	29017	Ja	<i>uncultured Telephoraceae</i>	JN704829.1
	29029	Ja	<i>Tomentella ellisii clone</i> <i>Tomentella spec.</i>	DQ068971.1 MH795007.1
	29031	Ja	<i>Tomentella ellisii clone</i> <i>Tomentella spec.</i>	DQ068971.1 MH795007.1
	29034	Ja	<i>uncultured Tomentella</i> <i>uncultured Tomentella</i>	HG426047.1 HG426015.1
	29027	Ja	<i>uncultured Telephoraceae</i>	JN704829.1
N481-97	28904	Nein	<i>uncultured fungus clone</i>	MG754927.1
	28907	Nein	<i>Tomentella ellisii clone</i> <i>Tomentella spec.</i>	DQ068971.1 MH795007.1
	28911	Nein	<i>Tomentella ellisii clone</i> <i>Tomentella spec.</i>	DQ068971.1 MH795007.1
	28915	Nein	<i>Tomentella ellisii clone</i> <i>Tomentella spec.</i>	DQ068971.1 MH795007.1
	28918	Nein	<i>Tomentella spec.</i>	MH795007.1
	28920	Ja	<i>Tomentella ellisii clone</i> <i>Tomentella spec.</i>	DQ068971.1 MH795007.1
	28922	Ja	<i>Tomentella ellisii clone</i> <i>Tomentella spec.</i>	DQ068971.1 MH795007.1
	28929	Ja	<i>Tomentella ellisii clone</i> <i>Tomentella spec.</i>	DQ068971.1 MH795007.1
	28931	Ja	<i>Tomentella ellisii clone</i> <i>Tomentella spec.</i>	DQ068971.1 MH795007.1
	28933	Ja	<i>Tomentella ellisii clone</i> <i>Tomentella spec.</i>	DQ068971.1 MH795007.1
N483-8	28964	Nein	<i>uncultured Tomentella</i> <i>uncultured Tomentella</i>	HG426047.1 HG426015.1
	28968	Nein	<i>uncultured fungus clone</i>	MG754927.1
	28969	Nein	<i>uncultured fungus clone</i>	MG754927.1
	28976	Nein	<i>Tomentella ellisii clone</i>	DQ068971.1
	28972	Nein	<i>Tomentella ellisii clone</i>	DQ068971.1
	28984	Ja	<i>uncultured fungus clone</i>	MG754927.1
	28989	Ja	<i>Tomentella spec.</i> <i>uncultured Tomentella</i>	MH795007.1 HG426047.1
	28990	Ja	<i>Tomentella ellisii clone</i> <i>Tomentella spec.</i>	DQ068971.1 MH795007.1
	28986	Ja	<i>Tomentella ellisii clone</i> <i>Tomentella spec.</i>	DQ068971.1 MH795007.1

3.6 Infektion von Pappeln mit *Melampsora spec.*

Zur Überprüfung, ob die Modifikationen in den *NFP-like*-Kandidatengenomen einen Einfluss auf die Anfälligkeit oder Resistenz gegenüber *Melampsora spec.* in Pappeln haben, wurden Infektionsversuche mit abgeschnittenen Blättern in der Klimakammer durchgeführt. Um zunächst das Toleranzspektrum in Pappeln gegenüber *Melampsora spec.* abschätzen zu können, wurden 20 Pappelklone aus drei verschiedenen Sektionen auf ihre Anfälligkeit bzw. Resistenz gegenüber *Melampsora larici-populina* und *Melampsora larici-tremulae* untersucht. Hierzu wurden Blattunterseiten in einer semi-feuchten Kammer mit Sporensuspension für 21 Tage inkubiert und bonitiert. Die Auswertung erfolgte durch iterative Abschätzung der befallenen Blattfläche in Prozent.

3.6.1 Gewinnung von geeigneten *Melampsora spec.* für Infektionsversuche

Zu Beginn dieser Arbeit stand nur der genom-sequenzierte *Melampsora larici-populina* Stamm 98AG31 (<https://genome.jgi.doe.gov/Mellp1/Mellp1.home.html>) zur Verfügung. Nach persönlicher Mitteilung von Pascal Frey (INRA, Nancy, Frankreich) werden Pappeln der Sektion *Populus* nicht von diesem Stamm infiziert. Zur Modifikation von Kandidatengenomen durch CRISPR/Cas9 wurden verschiedene Transformationsvektoren über Agrobakterienvermittelte Transformation in den Pappelklon INRA 717-1B4 (P1; *P. × canescens*) eingebracht.

Um eine mögliche veränderte Anfälligkeit gegenüber *Melampsora spec.* im verwendeten Pappelklon P1 analysieren zu können, werden *Melampsora*-Sporen benötigt, die Klone der Sektion *Populus* (inkl. P1) infizierten. Hierfür wurden im Oktober 2016 *Melampsora*-Sporen von Blattunterseiten von Pflanzen des Pappelklons P1 gesammelt, die seit 2013 im Arboretum des Thünen-Instituts für Forstgenetik (Großhansdorf, Deutschland) kultiviert werden.

Nach einer erfolgreichen Anzucht der *Melampsora*-Sporen auf dem Klon Brauna11 (Sektion *Populus*) wurden Sequenzanalysen zur Bestimmung des *Melampsora*-Stammes durchgeführt. Dies erfolgte nach DNA-Isolation aus Uredien des kollektierten Sporenmaterials und anschließender PCR-Reaktion und Sequenzierung der ITS-Region. Zur Artbestimmung wurden die ITS-Oligonukleotide ITS1-F (Gardes *et al.*, 1993) und ITS4 (White *et al.*, 1990), in Anlehnung an Feau *et al.* (2009) verwendet und das resultierende Amplikon für Sequenzanalysen eingesetzt. Nach Feau *et al.* (2009) handelte es sich bei den vorliegenden Sporen entweder um *Melampsora larici-tremulae* oder *Melampsora pinitorqua*, die beide dem Artkomplex *Melampsora populnea* angehören. Diese Einschätzung wurde anhand der dargelegten Sequenzen ebenfalls von Dr. Ben Bubner (Thünen Institut für Forstgenetik,

Waldsiefersdorf, Deutschland) in einer persönlichen Mitteilung bestätigt. Zur Differenzierung der beiden *Melampsora*-Stämme des kollektierten Sporenmaterials wurden die in Vialle *et al.* (2013) angegebenen Oligonukleotide für ITS Fun18SF (Pitkarana *et al.*, 2008) und ITS4BR (Vialle *et al.*, 2009) sowie die NAD6-Oligonukleotide (Vialle *et al.*, 2013) verwendet.

Die Sequenzen wurden mit den in Vialle *et al.* (2013) abgegebenen Sequenzen von ITS und NAD6 der *Melampsora*-Stämme *Melampsora larici-tremulae* und *Melampsora pinitorqua* verglichen. Über Sanger-Sequenzierung der ITS-Region konnte keine Aussage über die Zugehörigkeit des Stammes getätigt werden. Die Sequenzanalyse der NAD6-Region ergab, dass die kollektierten *Melampsora*-Sporen der Art *Melampsora larici-tremulae* angehörig waren. Das gewonnene Sporenmaterial war identisch zu den ITS- und NAD6-Sequenzen (Vialle *et al.*, 2013) der Arten MLT01F2 (ITS: JN881743; NAD6: JN985869), PFH-99-1 (ITS: JN881745; NAD6: JN985871) und MLT01F1 (ITS: EU808026; NAD6: FJ666494). Weiterführende Sequenzierungen der weiteren in Vialle *et al.* (2013) genannten Loci wurden nicht durchgeführt.

3.6.2 Infektionstest verschiedener Pappelklone

Zur Analyse des Toleranzspektrums verschiedener Pappelklone unterschiedlicher Sektionen gegenüber *Melampsora spec.* wurde neben dem in 3.6.1 beschriebenen Stamm *Melampsora larici-tremulae* der sequenzierte Stamm *Melampsora larici-populina* 98AG31 verwendet. Für die Infektionsversuche wurden 20 verschiedene Pappelklone eingesetzt: 5 Klone aus der Sektion *Aigeiros*, 5 Klone aus der Sektion *Tacamahaca*, 2 Hybridklone zwischen Vertretern aus den Sektionen *Tacamahaca* und *Aigeiros* sowie 8 Klone aus der Sektion *Populus*.

3.6.2.1 *Melampsora larici-tremulae*

Die Infektionstests mit *Melampsora larici-tremulae* zeigten, dass Sporenlager auf Pappelpflanzen der Sektion *Populus* und *Aigeiros* nachgewiesen werden konnten. Die Klone der Sektion *Tacamahaca* und ihre intersektionellen Hybride wiesen keine Infektionsmerkmale auf. Während alle Klone der Sektion *Populus* Sporenlager zeigten, konnten Sporenlager bei den *Aigeiros*-Klonen nur auf dem *P. nigra*-Klon P7 sowie dem *P. deltoides* × *P. nigra*-Hybrid DN5 beobachtet werden. Die weiteren verwendeten *Aigeiros*-Klone reagierten nicht auf die Inokulation mit *Melampsora larici-tremulae*.

Tabelle 3.28: Analyisierte Pappelklone im Hinblick auf Anfälligkeit bzw. Resistenz gegenüber *Melampsora larici-tremulae*

Angegeben sind die untersuchten Pappelklone bezüglich einer Anfälligkeit bzw. Resistenz gegenüber *Melampsora larici-tremulae*. Nach einer Inokulation der Sporensuspension auf den Blattunterseiten der Pappelklone wurde die infizierte Blattfläche 21 Tage nach der Inokulation iterativ abgeschätzt. Die Tabelle gibt an, ob Sporenlager vorhanden waren oder nicht. Blau: *Melampsora larici-tremulae*-Sporenlager auf inokulierten Blättern der Pappelklone; Weiß: keine Sporenlager auf inokulierten Blättern der Pappelklone.

Sektion (Eckenwalder, 1996)	Name	Art/Hybrid
<i>Aigeiros</i>	Aue2	<i>P. deltoides</i> × <i>P. nigra</i>
<i>Aigeiros</i>	D25	<i>P. deltoides</i>
<i>Aigeiros</i>	DN1	<i>P. deltoides</i> × <i>P. nigra</i>
<i>Aigeiros</i>	DN5	<i>P. deltoides</i> × <i>P. nigra</i>
<i>Aigeiros</i>	P7	<i>P. nigra</i>
<i>Aigeiros/Tacamahaca</i>	Max1	<i>P. nigra</i> × <i>P. maximowiczii</i>
<i>Tacamahaca/Aigeiros</i>	Rochester	<i>P. maximowiczii</i> × <i>P. nigra</i> var. <i>Plantierensis</i>
<i>Populus</i>	4x Göttingen	<i>P. × canescens</i> tetraploid (<i>P. tremula</i> × <i>P. alba</i>)
<i>Populus</i>	Astria	<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i> triploid
<i>Populus</i>	Brauna11	<i>P. tremula</i>
<i>Populus</i>	Esch5	<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>
<i>Populus</i>	P1 (INRA 717-1B4)	<i>P. × canescens</i> (<i>P. tremula</i> × <i>P. alba</i>)
<i>Populus</i>	T89	<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>
<i>Populus</i>	Villafranca	<i>P. alba</i>
<i>Populus</i>	W52	<i>P. tremula</i>
<i>Tacamahaca</i>	Androscoggin NW7-G22X	<i>P. maximowiczii</i> × <i>P. trichocarpa</i>
<i>Tacamahaca</i>	Muhle Larsen NW7-1975	<i>P. trichocarpa</i>
<i>Tacamahaca</i>	Nisqually	<i>P. trichocarpa</i>
<i>Tacamahaca</i>	Weser4 NW7-735G	<i>P. trichocarpa</i>
<i>Tacamahaca</i>	Weser6 NW7-737K	<i>P. trichocarpa</i>

3 Ergebnisse

Anhand der erhobenen Daten wurden die Mittelwerte der prozentual infizierten Blattfläche zum Boniturzeitpunkt 21 Tage nach Inokulation bestimmt und in Abbildung 3.37 grafisch dargestellt. Für den Pappelklon DN5 konnten lediglich auf einem Blatt Sporenlager von *Melampsora larici-tremulae* nachgewiesen werden, sodass dieser als gering anfällig zu werten war. In Sektion *Aigeiros*, war der reine *P. nigra*-Klon P7 am anfälligsten gegenüber *Melampsora larici-tremulae*. Die *Aigeiros*-Klone Aue2, DN25 und DN1 sowie die intersektionellen Hybride Max1 und Rochester zeigten keine Sporenlager nach Inokulation mit *Melampsora larici-tremulae*. In den untersuchten Klonen der Sektion *Populus* waren unterschiedlich starke Befallssymptome zu beobachten gewesen. Anhand der Mittelwerte ließen sich die *Populus*-Klone absteigend in ihrer Infektionsanfälligkeit gliedern:

W52 > Astria > Esch5 > T89 > 4x Göttingen > Brauna11 = P1 = Villafranca.

Der *P. tremula*-Klon W52 erwies sich in unter den gewählten Versuchsbedingungen als der anfälligste Klon, gefolgt von den *P. tremula* × *P. tremuloides*-Klonen Astria, Esch5 und T89. Es folgte der tetraploide *P. tremula* × *P. alba*-Klon 4x Göttingen, der ebenfalls anfälliger war als der diploide Klon P1. Der *P. tremula*-Klon Brauna11 befand sich mit seiner Anfälligkeit zwischen P1 und 4x Göttingen. Villafranca, eine *P. alba*, war der Klon mit der geringsten Anfälligkeit gegenüber *Melampsora larici-tremulae*. Zur Einschätzung der Anfälligkeit oder Resistenz gegenüber *Melampsora larici-tremulae* wurden anhand des Klons P1, der für die Infektionsversuche der transgenen Linien als Kontroll-Klon diente, signifikante Unterschiede zu allen verwendeten Wildtyp Pappelklonen bestimmt, die Infektionsmerkmale zeigten. Villafranca und Brauna11 waren im Vergleich zum Kontroll-Klon P1 nicht unterschiedlich infiziert. Die Blätter der Klone Astria, Esch5, 4x Göttingen, T89 und W52 waren im Mittel signifikant stärker mit Sporenlagern bedeckt als P1. Ebenfalls im Mittel stärker mit Sporenlagern bedeckt war der *Aigeiros*-Klon P7 im Vergleich zum Kontroll-Klon P1. Signifikant geringer infiziert als der Kontroll-Klon P1 war der *Aigeiros*-Klon DN5.

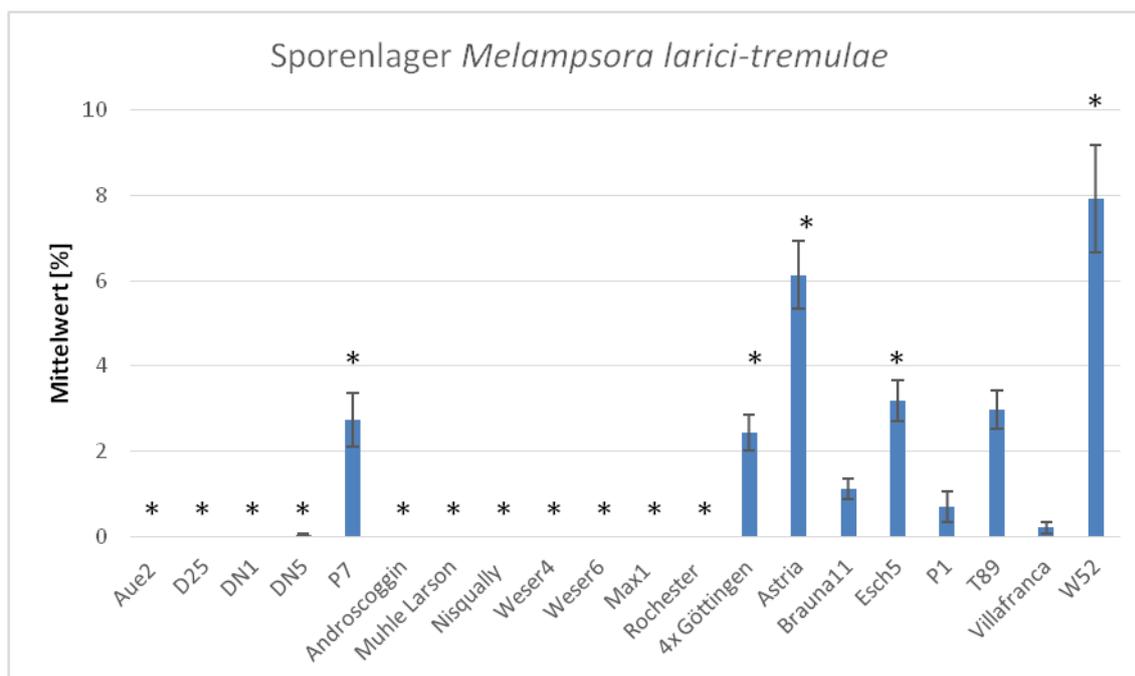


Abbildung 3.37: Mittelwert und SE der prozentualen durch Sporenlager eingenommenen Fläche nach Inokulation mit *Melampsora larici-tremulae*

Säulendiagramme zur im Mittel mit Sporenlager bedeckten Blattfläche aller inokulierter Pappelklone. Angegeben sind der Mittelwert sowie der Standardfehler (SE) als vertikale Linie zum Boniturstag 21 nach Inokulation mit *Melampsora larici-tremulae*. 95 % Signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Kontroll-Klon P1 ist mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet (Grafik aus Deecke und Fladung, 2021).

Da die Verteilung der Daten von einer Normalverteilung abweichen, findet sich eine Darstellung der Daten als Boxplots im Anhang unter Abbildung 6.7. Die beschriebene Infektionsstärke der *Populus*-Klone sowie der *Aigeiros*-Klone wurde dadurch erneut bestätigt. Zusammenfassend waren die *Populus*-Klone P1, Brauna11 und Villafranca geringer anfällig gegenüber *Melampsora larici-tremulae* als die *Populus*-Klone Astria, Esch5, 4x Göttingen, T89 und W52. Die *Tacamahaca*-Klone waren auf Grund dieser Analyse tolerant gegenüber *Melampsora larici-tremulae*.

3.6.2.2 *Melampsora larici-populina* (98AG31)

Bei der Untersuchung zur Resistenz oder Anfälligkeit gegenüber *Melampsora larici-populina* (98AG31) zeigte sich, dass Sporenlager auf allen Klonen der Sektion *Tacamahaca* sowie deren intersektionellen Hybriden nachgewiesen werden konnten. Vereinzelt konnten Sporenlager auf den Klonen der Sektion *Populus* und *Aigeiros* beobachtet werden (Tabelle 3.29). Der *P. nigra*-Klon P7 sowie der *P. deltoides* × *P. nigra*-Hybrid Aue2 zeigten Infektionsmerkmale, die *P. nigra* × *P. deltoides*-Hybride DN1 und DN5 hingegen nicht. Ebenso wies der *P. deltoides*-Klon D25 keine Infektionsmerkmale auf. Drei Klone der

3 Ergebnisse

Sektion *Populus* mit nachweisbaren Infektionsmerkmalen waren der *P. tremula*-Klon Brauna11 sowie die *P. tremula* × *P. tremuloides*-Hybride Astria und T89 (Tabelle 3.29). Wiederrum konnten keine Sporenlager auf dem *P. tremula*-Klon W52 oder dem *P. tremula* × *P. tremuloides*-Hybrid Esch5 beobachtet werden.

Tabelle 3.29: Analyisierte Pappelklone im Hinblick auf Anfälligkeit bzw. Resistenz gegenüber *Melampsora larici-populina*

Angegeben sind die untersuchten Pappelklone bezüglich einer Anfälligkeit bzw. Resistenz gegenüber *Melampsora larici-populina*. Nach einer Inokulation der Sporensuspension auf den Blattunterseiten der Pappelklone wurde die infizierte Blattfläche 21 Tage nach der Inokulation iterativ abgeschätzt. Die Tabelle gibt an, ob Sporenlager vorhanden waren oder nicht. Blau: *Melampsora larici-populina*-Sporenlager auf inokulierten Blättern der Pappelklone; Weiß: keine Sporenlager auf inokulierten Blättern der Pappelklone nachgewiesen.

Sektion (Eckenwalder, 1996)	Name	Art/Hybrid
Aigeiros	Aue2	<i>P. deltoides</i> × <i>P. nigra</i>
Aigeiros	D25	<i>P. deltoides</i>
Aigeiros	DN1	<i>P. deltoides</i> × <i>P. nigra</i>
Aigeiros	DN5	<i>P. deltoides</i> × <i>P. nigra</i>
Aigeiros	P7	<i>P. nigra</i>
Aigeiros/Tacamahaca	Max1	<i>P. nigra</i> × <i>P. maximowiczii</i>
Tacamahaca/Aigeiros	Rochester	<i>P. maximowiczii</i> × <i>P. nigra</i> var. <i>Plantierensis</i>
<i>Populus</i>	4x Göttingen	<i>P. × canescens</i> tetraploid (<i>P. tremula</i> × <i>P. alba</i>)
<i>Populus</i>	Astria	<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i> triploid
<i>Populus</i>	Brauna11	<i>P. tremula</i>
<i>Populus</i>	Esch5	<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>
<i>Populus</i>	P1 (INRA 717-1B4)	<i>P. × canescens</i> (<i>P. tremula</i> × <i>P. alba</i>)
<i>Populus</i>	T89	<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>
<i>Populus</i>	Villafranca	<i>P. alba</i>
<i>Populus</i>	W52	<i>P. tremula</i>
Tacamahaca	Androscoggin NW7-G22X	<i>P. maximowiczii</i> × <i>P. trichocarpa</i>
Tacamahaca	Muhle Larsen NW7-1975	<i>P. trichocarpa</i>
Tacamahaca	Nisqually	<i>P. trichocarpa</i>
Tacamahaca	Weser4 NW7-735G	<i>P. trichocarpa</i>
Tacamahaca	Weser6 NW7-737K	<i>P. trichocarpa</i>

3 Ergebnisse

Anhand der erhobenen Daten wurden die Mittelwerte der prozentual infizierten Blattfläche zum Boniturzeitpunkt 21 Tage nach Inokulation bestimmt und in Abbildung 3.38 grafisch dargestellt. Deutlich ersichtlich war, dass die im Mittel durch Sporenlager eingenommene Fläche bei den *Populus*-Klonen Astria, Brauna11 und T89 im Vergleich zu den Klonen anderer Sektionen am geringsten war. Androscoggin und Nisqually waren im Mittelwert identisch und ebenfalls identisch zum intersektionellen Hybrid Rochester, dies wurde ebenfalls über die Datenverteilung der Boxplots (Abbildung 6.6 Anhang) bestätigt. Bei einer abstufigen Verteilung würden die *Tacamahaca*-Klone sowie deren intersektionelle Hybride wie folgt sortiert werden:

Nisqually = Androscoggin = Rochester > Weser6 > Max1 > Muhle Larsen > Weser4.

Die *Aigeiros*-Klone P7 und Aue2 waren beide anfällig gegenüber *Melampsora larici-populina*, wobei der *P. deltoides* × *P. nigra*-Klon Aue2 widerstandsfähiger war, als der *P. nigra*-Klon P7.

Zusammenfassend konnten für die *Populus*-Klone signifikante Unterschiede zu dem Vergleichsklon Nisqually der Sektion *Tacamahaca* nachgewiesen werden. Die *Populus*-Klone waren signifikant geringer infiziert als der Vergleichsklon Nisqually. Die Klone Aue2, Muhle Larsen, Weser4 und Max1 waren im Mittel signifikant geringer infiziert als der Vergleichsklon Nisqually. Weiterhin wurde die Anfälligkeit bzw. Resistenz im Vergleich mit den Pappelklonen anderer Sektionen betrachtet. Als Kontroll-Klon diente der Pappelklon Astria, der im Vergleich mit den Klonen anderer Sektionen im Mittel signifikant geringer anfällig gegenüber *Melampsora larici-populina* war. Im Vergleich mit den *Populus*-Klonen Brauna11 und T89 war Astria im Mittel anfälliger. Der *Melampsora larici-populina*-Stamm kam für die Testung der transgenen *NFP-like* modifizierten Linien nicht in Frage, da auf dem Kontroll-Klon P1 keine Sporenlager nachgewiesen werden konnten.

3 Ergebnisse

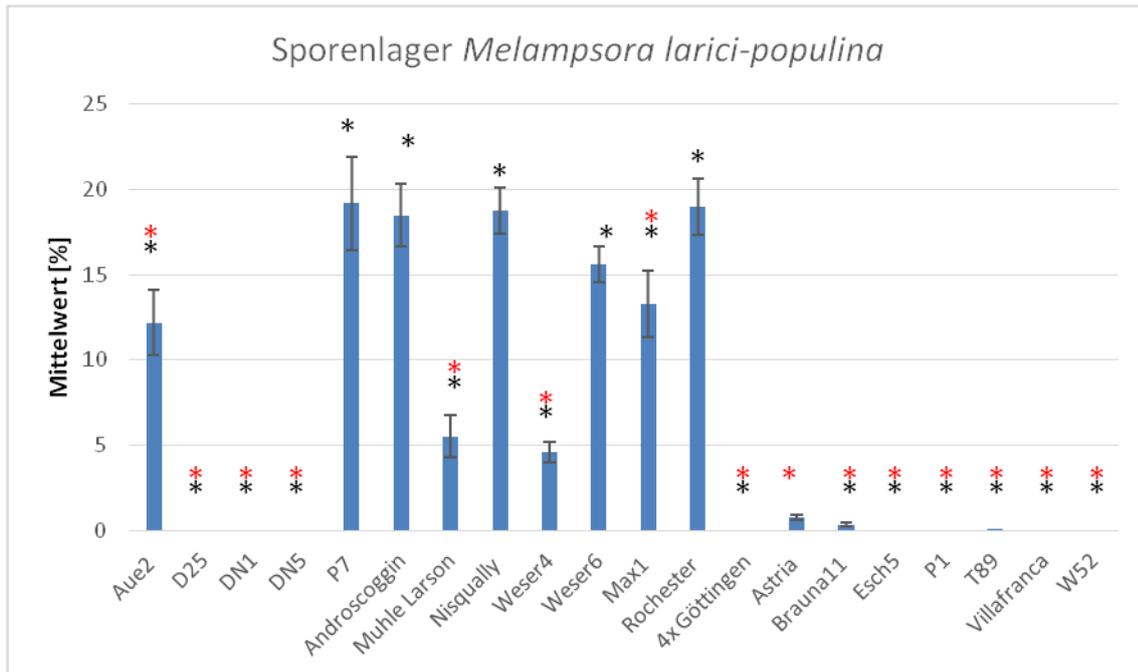


Abbildung 3.38: Mittelwert und SD der prozentualen durch Sporenlager eingenommenen Fläche nach Inokulation mit *Melampsora larici-populina*

Säulendiagramme zur im Mittel mit Sporenlager bedeckte Blattfläche aller getesteter Pappelklone. Angegeben sind der Mittelwert sowie der Standardfehler (SE) als vertikale Linie zum Boniturtag 21 nach Inokulation mit *Melampsora larici-populina*. 95 % signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Kontroll-Klon Astria ist mit einem schwarzen Sternchen (*), im Vergleich zum Kontroll-Klon Nisqually mit einem roten Sternchen (*) gekennzeichnet (Grafik aus Deecke und Fladung, 2021).

3.6.2.3 Nekrotische Reaktion auf die Inokulation mit *Melampsora spec.*

Neben den Sporenlagern konnte bei der Bonitur ein weiteres Merkmal nach der Inokulation mit *Melampsora spec.* beobachtet werden. Nach der Inokulation mit *Melampsora larici-populina* war auf den Blättern zahlreicher Pappelklone neben der Ausbildung der Sporenlager sich teilweise schwarz verfärbende Bereiche auf den Blattflächen sichtbar (Abbildung 3.39). Bei der Ausbildung von schwarzen Flecken wurden teilweise keine Sporenlager ausgebildet (Abbildung 3.39 B) oder die schwarzen Bereiche umschlossen vorhandene Sporenlager (Abbildung 3.39 A). Die schwarz verfärbten Bereiche sind ein Anzeichen für eine nekrotische Reaktion auf das Inokulat.

3 Ergebnisse

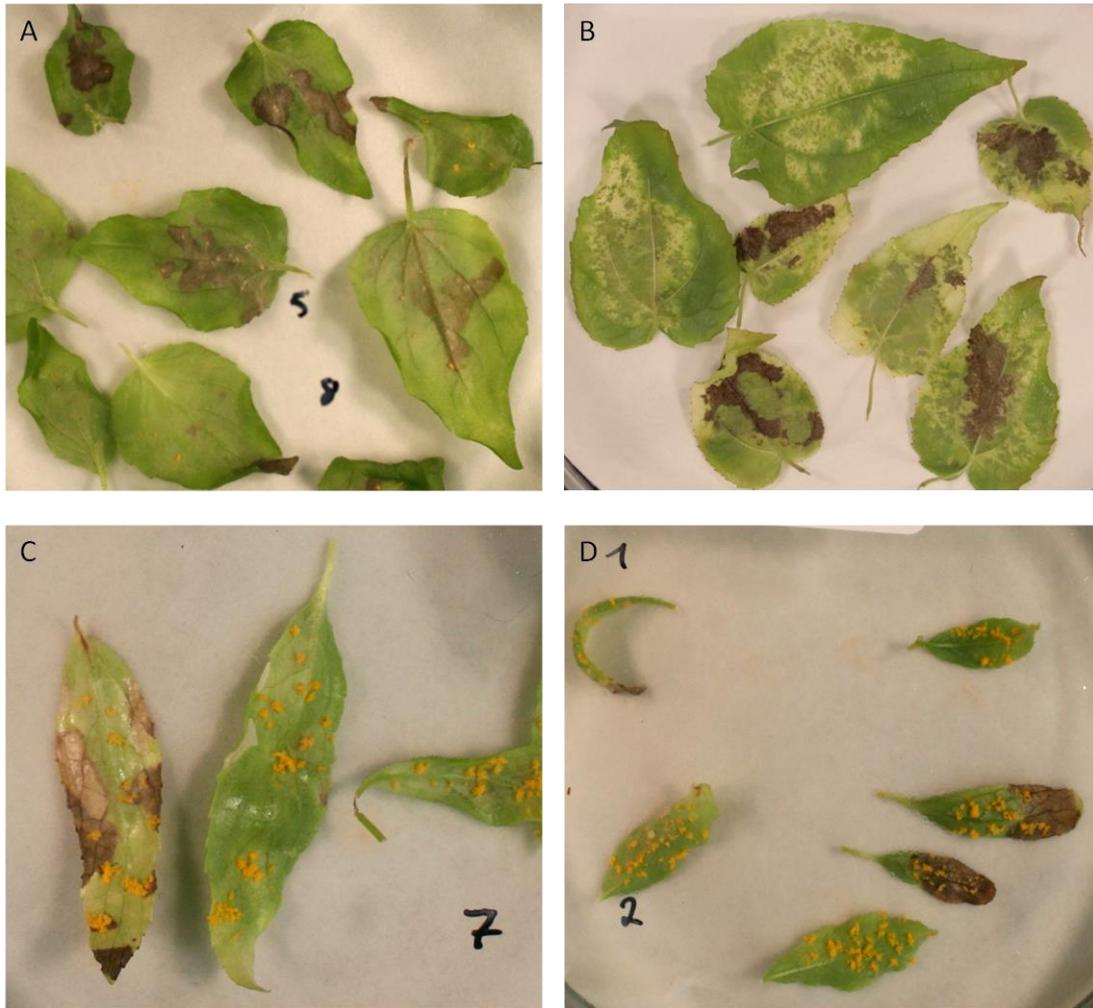


Abbildung 3.39: Reaktion der einiger Pappelklone auf *Melampsora larici-populina*

Fotografische Aufnahmen am Tag 21 nach Inokulation mit *Melampsora larici-populina* (98AG31). A: Astria; B: Brauna11; C: Nisqually; D: Rochester. Die Nummern in A, C und D dienen lediglich der Orientierung bei der Bonitur.

Die nekrotische Reaktion wurde nur auf vereinzelt Blättern beobachtet, sodass bei dem gleichen Pappelklon Blätter mit schwarzen Flecken vorhanden waren und andere, die keine dementsprechende Reaktion zeigten (Abbildung 3.39 C und D). Die nekrotische Reaktion betraf für das Inokulat mit *Melampsora larici-populina* 13 von 20 Pappelklonen, wohingegen bei der Inokulation mit *Melampsora larici-tremulae* 3 von 20 Pappelklonen eine nekrotische Reaktion zeigten (Tabelle 3.30). Hervorzuheben ist, dass auf 6 der 8 getesteten *Populus*-Klone nekrotische Flecken nachgewiesen wurden. Eine nekrotische Reaktion konnte nach Inokulation mit *Melampsora larici-tremulae* auf den Klonen Villafranca, Nisqually und DN1 beobachtet werden. Villafranca zeigte auf 7 von 40 inokulierten Blättern nekrotische Flecken, Nisqually auf 3 von 45 inokulierten Blättern und DN1 auf 3 von 48 inokulierten Blättern.

3 Ergebnisse

Tabelle 3.30: Analyierte Pappelklone im Hinblick auf eine Ausbildung nekrotischer Bereiche bei Inokulation mit *Melampsora larici-populina* oder *Melampsora larici-tremulae*

Angegeben sind die untersuchten Pappelklone bezüglich einer Reaktion auf das Inokulat mit *Melampsora larici-populina* oder *Melampsora larici-tremulae* durch Nekrose. Nach einer Inokulation der Sporensuspension auf den Blattunterseiten der Pappelklone wurde die verfärbte Blattfläche 21 Tage nach der Inokulation iterativ abgeschätzt. Die Tabelle gibt an, ob nekrotische Flecken vorhanden waren, oder nicht. Blau: Nekrotische Reaktion nach Inokulation mit *Melampsora larici-populina*; grün: Nekrotische Reaktion nach Inokulation mit *Melampsora larici-tremulae*; orange: Nekrotische Reaktion bei beiden verwendeten *Melampsora spec.*; weiß: keine Ausbildung einer nekrotischen Reaktion nach Inokulation.

Sektion (Eckenwalder, 1996)	Name	Art/Hybrid
<i>Aigeiros</i>	Aue2	<i>P. deltoides</i> × <i>P. nigra</i>
<i>Aigeiros</i>	D25	<i>P. deltoides</i>
<i>Aigeiros</i>	DN1	<i>P. deltoides</i> × <i>P. nigra</i>
<i>Aigeiros</i>	DN5	<i>P. deltoides</i> × <i>P. nigra</i>
<i>Aigeiros</i>	P7	<i>P. nigra</i>
<i>Aigeiros/Tacamahaca</i>	Max1	<i>P. nigra</i> × <i>P. maximowiczii</i>
<i>Tacamahaca/Aigeiros</i>	Rochester	<i>P. maximowiczii</i> × <i>P. nigra</i> var. <i>Plantierensis</i>
<i>Populus</i>	4x Göttingen	<i>P. × canescens</i> tetraploid (<i>P. tremula</i> × <i>P. alba</i>)
<i>Populus</i>	Astria	<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i> triploid
<i>Populus</i>	Brauna11	<i>P. tremula</i>
<i>Populus</i>	Esch5	<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>
<i>Populus</i>	P1 (INRA 717-1B4)	<i>P. × canescens</i> (<i>P. tremula</i> × <i>P. alba</i>)
<i>Populus</i>	T89	<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>
<i>Populus</i>	Villafranca	<i>P. alba</i>
<i>Populus</i>	W52	<i>P. tremula</i>
<i>Tacamahaca</i>	Androscoggin NW7-G22X	<i>P. maximowiczii</i> × <i>P. trichocarpa</i>
<i>Tacamahaca</i>	Muhle Larsen NW7-1975	<i>P. trichocarpa</i>
<i>Tacamahaca</i>	Nisqually	<i>P. trichocarpa</i>
<i>Tacamahaca</i>	Weser4 NW7-735G	<i>P. trichocarpa</i>
<i>Tacamahaca</i>	Weser6 NW7-737K	<i>P. trichocarpa</i>

3 Ergebnisse

Anhand der erhobenen Daten wurden die Mittelwerte der prozentual mit nekrotischen Flecken bedeckte Blattfläche zum Boniturzeitpunkt 21 Tage nach Inokulation bestimmt und in Abbildung 3.40 grafisch für die Inokulation mit *Melampsora larici-populina* dargestellt.

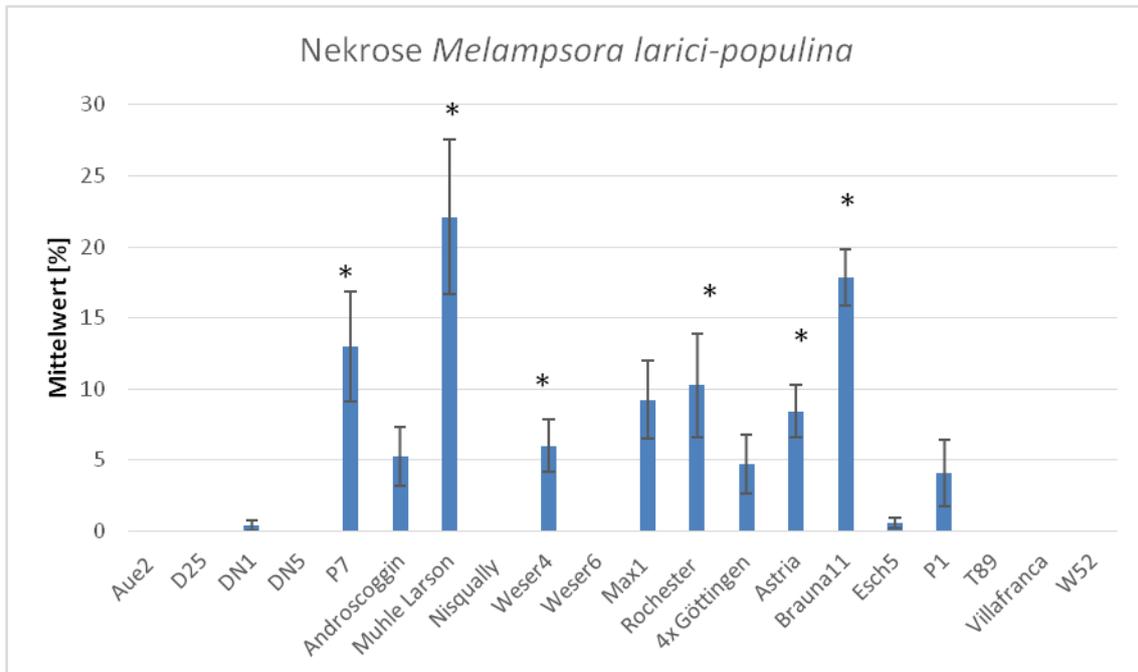


Abbildung 3.40: Mittelwert und SE der prozentualen durch Nekrose eingenommenen Fläche nach Inokulation mit *Melampsora larici-populina*

Säulendiagramme zur im Mittel mit schwarzen Flecken bedeckte Blattfläche aller getesteten Pappelklone. Angegeben ist die Blattfläche, auf denen Sporenlager nachgewiesen wurden. Angegeben sind der Mittelwert sowie der Standardfehler (SE) als vertikale Linie zum Boniturtag 21 nach Infektion mit *Melampsora larici-populina*. 95 % signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Kontroll-Klon P1 ist mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

In Abbildung 3.40 ist zu erkennen, dass der Standardfehler beispielsweise bei Muhle Larsen stark vom Mittelwert abweicht. Die erhobenen Daten zur nekrotischen Reaktion weichen von einer Normalverteilung ab. Zur Veranschaulichung der Datenverteilung sind die Daten in Abbildung 6.8 im Anhang dargestellt. Zur Bestimmung signifikanter Unterschiede zwischen den Klonen wurde der *Populus*-Klon P1 als Kontroll-Klon gewählt. Es zeigte sich, dass die *Populus*-Klone Astria und Brauna11, der *Aigeiros*-Klon P7, die *Tacamahaca*-Klone Muhle Larsen und Weser4 sowie der intersektionelle Hybrid Rochester im Mittel signifikant unterschiedlich zum Kontroll-Klon P1 waren. Anhand der im Mittel durch schwarze Flecken eingenommenen Blattfläche war zu erkennen, dass unter den *Populus*-Klonen Brauna11 die stärkste Reaktion auf das Inokulat mit *Melampsora larici-populina* zeigte, darauf folgten absteigend die Klone

Astria > 4x Göttingen > P1 > T89 > Esch5.

3 Ergebnisse

Beim Vergleich der durch Sporenlager im Mittel eingenommenen Blattfläche (Abbildung 3.37) mit der durch Nekrose im Mittel bedeckten Blattfläche ist ersichtlich, dass Brauna11 eine im Mittel geringe Fläche mit Sporenlagern aufwies. Bei den *Aigeiros*-Klonen wies P7 im Mittel eine größere Fläche mit einer Reaktion auf das Inokulat auf als DN1. Bei den *Tacamahaca*-Klonen zeigte Muhle Larsen im Mittel die größte Fläche mit einer Reaktion auf das Inokulat, absteigend folgen die intersektionellen Hybride Rochester und Max1, denen wiederum von den *Tacamahaca*-Klone Androscoggin und Weser4 folgten.

Zum Vergleich der Reaktion mit schwarzen Flecken auf die Ausbildung der Sporenlager wurde die Anzahl der Blätter mit Sporenlagern und/oder schwarzen Flecken verglichen. Der *Aigeiros*-Klon DN1 und der *Tacamahaca*-Klon Nisqually wiesen schwarze Flecken als Reaktion auf das *Melampsora larici-tremulae*-Inokulat auf, es bildeten sich jedoch keine Sporenlager aus. Bei dem *Populus*-Klon Villafranca konnten sieben Blätter mit sich schwarz färbenden Bereichen und vier Blätter mit Sporenlagern beobachtet werden, lediglich ein Blatt zeigte beide Merkmale.

Bei der Inokulation mit *Melampsora larici-populina* konnten ausschließlich schwarze Flecken ohne die Bildung von Sporenlagern für die *Populus*-Klone Esch5, 4x Göttingen, P1 und den *Aigeiros*-Klon DN1 beobachtet werden. Die Verteilung des jeweiligen Schadbildes ist für die verbliebenen Pappelklone in Tabelle 3.31 gelistet.

Tabelle 3.31: Vergleich Sporenlager und Nekrose nach Inokulation mit *Melampsora larici-populina*

Anzahl der Blätter, die entweder Sporenlager und/oder Nekrose nach Inokulation mit *Melampsora larici-populina* zum Boniturtag 21 zeigten. Dargestellt sind alle Blätter mit Sporenlagern oder Nekrose sowie die Anzahl der Blätter die kombiniert beide Merkmale trugen.

Klon	Sporenlager	Nekrose	Sporenlager und Nekrose
Astria	30	29	24
Brauna11	11	44	7
T89	5	7	2
P7	32	18	17
Androscoggin NW7-G22X	34	12	12
Muhle Larsen NW7-1975	23	19	13
Weser4 NW7-735G	34	16	15
Max1	39	13	11
Rochester	37	16	13

3 Ergebnisse

Zur Überprüfung, ob die Ausbildung von nekrotischen Strukturen mit wenig Sporenlagern einhergeht, wurden die Daten in Abbildung 3.41 für die verwendeten *Melampsora spec.* veranschaulicht. Der *Populus*-Klon Villafranca wies auf 4 von 40 inokulierten Blättern Sporenlager auf, wohingegen 7 Blätter eine nekrotische Reaktion zeigten. Dabei war die durch die Nekrose eingenommene prozentuale Fläche größer als die durch Sporenlager bedeckte Blattfläche. Eine ähnliche Verteilung wurde für die *Populus*-Klone Astria, Brauna11 und T89 nach Inokulation mit *Melampsora larici-populina* beobachtet (Abbildung 3.41) Der *P. nigra*-Klon P7 reagierte gleichermaßen mit Nekrose und Sporenlagern. Von den *Tacamahaca*-Klonen zeigte Muhle Larsen die prozentual größte Fläche mit schwarzen Flecken und im Gegensatz dazu eine prozentual geringe Fläche, auf der Sporenlager vorhanden waren.

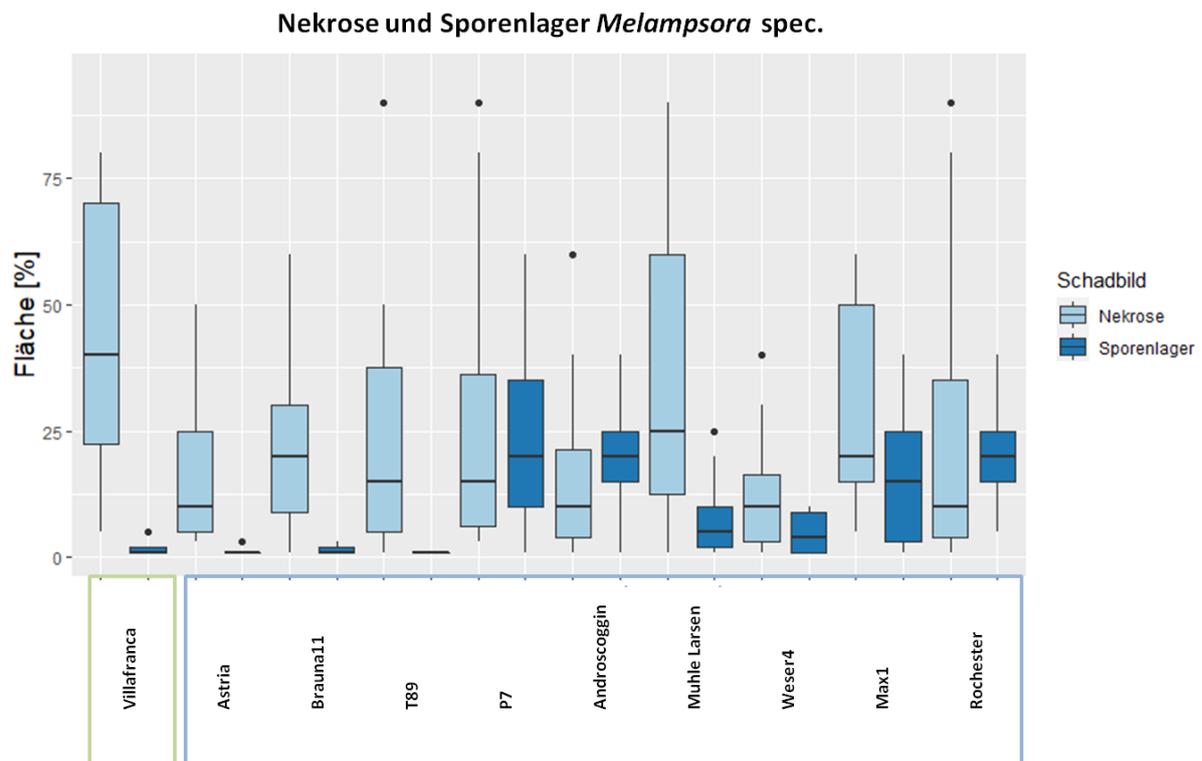


Abbildung 3.41 Vergleich der Nekrose und Sporenlager ausgewählter Pappelklone nach Inokulation mit *Melampsora spec.*

Boxplots der Blätter die zum Boniturtag 21 nachweislich Sporenlager und/oder schwarze Flecken als Reaktion auf die Inokulation mit *Melampsora larici-tremulae* (grünes Rechteck) oder *Melampsora larici-tremulae* (blaues Rechteck) zeigten. Gliederung der Boxplots in 25 % Quantil, Median, 75 % Quantil in Farbe, Extremwerte sind durch vertikale Linien dargestellt, Ausreißer als schwarze Punkte gekennzeichnet.

3.6.3 Testung der Anfälligkeit von *NFP-like* modifizierten Pappellinien

Zur Analyse einer veränderten Anfälligkeit gegenüber *Melampsora spec.* in den durch CRISPR/Cas9 modifizierten Pappelklon *P. × canescens* (P1) wurde der *Melampsora larici-tremulae*-Stamm verwendet. Die Expressionsanalysen der Kandidatengene in verschiedenen Geweben zur Analyse einer möglichen Funktion der Kandidatengene (Abschnitt 3.2) wiesen darauf hin, dass *NFP-like3* und *NFP-like4* in den Blättern stärker exprimiert ist als im Wurzelgewebe. Die Infektionsversuche sollten daher die Hypothese überprüfen, ob *NFP-like3* und *NFP-like4* eine mögliche Funktion im Resistenzverhalten gegenüber *Melampsora spec.* innehaben. Weiterhin wurden alle Linien, die eine Modifikation in *NFP-like1* aufwiesen, auf eine veränderte Anfälligkeit oder Resistenz gegenüber *Melampsora larici-tremulae* untersucht.

Um einen Unterschied in der Anfälligkeit oder Resistenz gegenüber *Melampsora larici-tremulae* in den durch CRISPR/Cas9 veränderten Linien, im Vergleich zur nicht-transgenen P1 zu bestimmen, wurde P1 sowie die Negativkontrolle Nisqually in den Versuchsansatz einbezogen. Auf Grund der Vielzahl der zu testenden transgenen Pappellinien wurden die Infektionsversuche in drei Versuchsansätze, anhand derer der Unterschied in einer veränderten Anfälligkeit in den modifizierten Linien untersucht werden sollte, unterteilt.

Die im Versuchsansatz I getesteten Linien N481-2, N481-15 und N482-24 erwiesen sich im Befall mit *Melampsora larici-tremulae* als nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zum nicht-transgenen Kontroll-Klon P1 (Tabelle 6.8 Anhang). Dagegen zeigten sich die Linien N481-9, N481-15, N481-33 und N481-44 im Vergleich zu P1 statistisch als signifikant unterschiedlich. Im Versuchsansatz II war die Linie N482-47 signifikant unterschiedlich zum Kontroll-Klon P1. Weitere transgene Linien wurden im Versuchsansatz II nicht untersucht. Im Versuchsansatz III war lediglich N481-97 in der Verteilung nicht signifikant unterschiedlich zum Kontroll-Klon P1, die Linien N483-8, N484-3 und N484-6 mit einer Dreifachmodifikation waren signifikant unterschiedlich zum Kontroll-Klon P1. Die transgenen Linien N483-8, N484-3 und N484-6, die in allen drei *NFP-like*-Genen modifiziert wurden, waren nach statistischer Analyse mittels des Wilcoxon-Tests signifikant unterschiedlich im Vergleich zum nicht-transgenen Kontroll-Klon P1.

Zur Veranschaulichung der statistischen Analyse sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichung in Abbildung 3.42 grafisch dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Werte stark um den Mittelwert streuen. Weiterhin war zu erkennen, dass das Mittel der infizierten Flächen vom Kontroll-Klon P1 und Nisqually in den unterschiedlichen Ansätzen ebenfalls nicht identisch war. Im Ansatz I lag das Mittel der nicht anfälligen Nisqually bei

3 Ergebnisse

0 % infizierter Fläche, wohingegen im Ansatz II die infizierte Fläche bei 0,85 % lag. Zur Überprüfung der statistischen Analyse bezüglich einer unterschiedlichen Verteilung vom Kontroll-Klon P1 zu den transgenen Linien, wurden die Daten grafisch unter Verwendung von Boxplots mit dem Grafikpaket ggPlot (Wickham, 2009) dargestellt (Abbildung 6.9 Anhang). Anhand der grafischen Darstellung in Boxplots konnten die statistischen Unterschiede bestätigt werden.

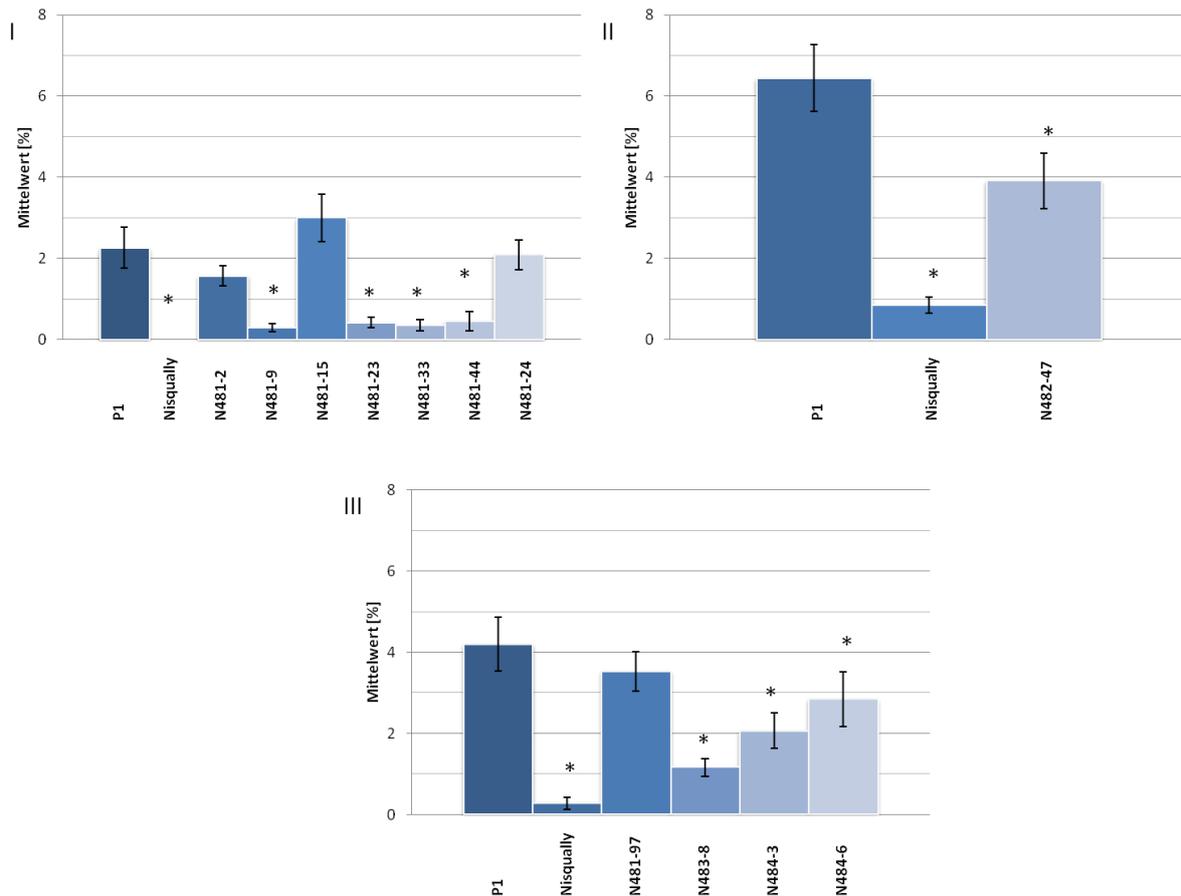


Abbildung 3.42: Mittelwert und SE der prozentualen durch Sporenlager eingenommenen Fläche von *NFP-like* veränderten Pappelinien nach Inokulation mit *Melampsora larici-tremulae*
 Säulendiagramme zur im Mittel mit Sporenlager bedeckte Blattfläche aller transgener Linien sowie der Kontroll-Klone. Angegeben sind der Mittelwert sowie der Standardfehler (SE) als vertikale Linie zum Boniturtag 21 nach Infektion mit *Melampsora larici-tremulae*. I: Versuchsansatz I, II: Versuchsansatz II, III: Versuchsansatz III. 95 % signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Kontroll-Klon P1 ist mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

Zusammenfassend konnte in keiner Linie eine signifikant gesteigerte Anfälligkeit gegenüber *Melampsora larici-tremulae* durch Modifikation der Kandidatengene im Vergleich zum Kontroll-Klon P1 nachgewiesen werden. Jedoch war zu beobachten, dass die Linien der N481-Transformation unterschiedlich anfällig waren. So entsprachen die Linien N481-97, N481-2 und N481-15 in ihrer Verteilung in den jeweiligen Versuchen dem Kontroll-Klon P1, während die verbliebenen vier Linien signifikant unterschiedlich zum Kontroll-Klon P1 waren. Die N482-Transformation ergab zwei zu testende Linien, von denen die N482-24 nicht signifikant und N482-47 nach dem statistischen Test signifikant unterschiedlich war. Die Linien N483-8, N484-3 und N484-6 waren nach dem statistischen Test im Vergleich zum Kontroll-Klon P1 signifikant unterschiedlich.

4 Diskussion

4.1 Fragestellungen des Forschungsvorhabens

Zur Erzeugung von Bioenergie werden Pappeln in Kurzumtriebsplantagen (KUPs) angebaut. Die Umtriebszeiten von KUPs umfassen je nach Verwendungsziel 3–20 Jahre (<https://pflanzen.fnr.de/energiepflanzen/anbausysteme/energieholz/>, 15.10.2019). Während der Umtriebszeiten sind die Pflanzen äußeren Faktoren ausgesetzt, die einen Effekt auf die Biomasseerzeugung haben können. Insbesondere durch die Klimaveränderung sind die Pflanzen immer extremeren Bedingungen wie Trockenstress oder Überwässerung ausgesetzt. Neben den abiotischen Einflüssen können sich Krankheitserreger auf die Biomasseerzeugung auswirken. Besonders der phytopathogene Pilz *Melampsora spec.*, der als Pappelrost bezeichnet wird, kann den Ertrag bei Pappeln um 50 % mindern (Husson *et al.*, 2013). Um die Resistenz der Pflanze gegenüber Pathogenen und Umwelteinflüssen zu erhöhen, können mykorrhizierende Pilze eingesetzt werden. Die Symbiose zwischen zwei ungleichen Organismen zur gegenseitigen Förderung in einer Wechselbeziehung der Symbiosepartner wurde erstmals 1879 von De Bary beschrieben. Frank (1885) berichtete über eine symbiontische Beziehung zwischen dem Wurzelgeflecht von Bäumen und mycelartigem Pilzgewebe, das die Ernährung des Baumes aus dem Boden übernimmt. Das pilzliche Mycel umhüllt die Wurzeln des Baumes vollständig, sodass sich ein nicht trennbares Geflecht beider Organismen ausbildet (Frank, 1885). Das entstandene Geflecht wurde von Frank (1885) als Pilzwurzel und in diesem Zuge als Mykorrhiza bezeichnet. Zum Vorteil beider Organismen wird die Wasser- und Nährstoffaufnahme aus dem Boden über das pilzliche Mycel gewährleistet, während der Pilz die Kohlenstoffverbindungen der Pflanze aufnimmt (Frank, 1885). Eine Symbiose zwischen der Pflanze und dem Pilz dient daher der besseren stofflichen Aufnahme der Mineralien aus dem Boden (Bonfante *et al.*, 2009). Unter Stressbedingung kann die Symbiose mit Mykorrhiza-Pilzen den Biomasseverlust reduzieren (Liu *et al.*, 2015). Pflanzen reagieren bei Besiedelung von Pilzen auf das in der pilzlichen Zellwand enthaltene Chitin mit einer spezifischen über in der pflanzlichen Zellwand befindliche Rezeptoren ablaufenden Reaktionen, die als „*pathogen associated molecular pattern*“ (PAMP) bezeichnet werden (Chrisholm *et al.*, 2006). Die Chitin-erkennenden Rezeptoren enthalten Lysin-Motiv-Rezeptor-ähnliche Kinasen (LysM-RLKs) und vermitteln in Folge einer Chitin-Erkennung nach Befall mit phytopathogenen Pilzen die Immunantwort der Pflanze (Antolin-Llovera *et al.*, 2012). Bei der Ausbildung einer Symbiose mit mykorrhizierenden Pilzen jedoch wird die Immunantwort unterdrückt oder übergangen.

4 Diskussion

Eine Möglichkeit, die Pappel besser an widrige Umwelteinflüsse anzupassen, könnte durch eine erhöhte Mykorrhizierung sowie eine Verminderung der Anfälligkeit gegenüber Pappelrost erreicht werden. Hierfür wurden vier LysM-RLK-Kandidatengene auf ihre Funktion bei der Ausbildung einer Symbiose mit mykorrhizierenden Pilzen und der Resistenz gegenüber *Melampsora spec.* untersucht. Die gewählten LysM-RLK-Kandidatengene werden im Folgenden als *NFP-like*-Kandidatengene auf Grund ihrer möglichen Funktion als „*NOD-Factor Perception*“ bezeichnet. NOD-Faktoren sind Chitin-Oligosaccharide, die eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der Symbiose zwischen Leguminosen und Rhizobien (Knöllchenbakterien) spielen (Gust *et al.*, 2012). *NFP-like1* (Potri.005G128400) kodiert für eine Kinase die auf Chromosom 5, *NFP-like2* (Potri.007G032300) für eine Kinase auf Chromosom 7, *NFP-like3* (Potri.008G160600) für eine Kinase auf Chromosom 8 und *NFP-like4* (Potri.010G078700) für eine Kinase, die auf Chromosom 10 lokalisiert ist.

Madsen *et al.* (2003) untersuchten die Funktion von *NFP5* in *Lotus japonicus*. *NFP5* kodiert für zwei Rezeptor-Kinasen auf drei Allelen in den *nfp5*-Mutanten. Die Mutationen erwiesen sich als eine Deletion von 27 Nukleotiden in *nfp5-1*, das zu einer Deletion von neun Aminosäuren um die Kinase-Domäne führt und daher vermutlich die Funktion der Kinase-Domäne beeinflusst (Madsen *et al.*, 2003). In *nfp5-2* befindet sich ein Retrotransposon und in *nfp5-3* eine Punktmutation, die ein vorzeitiges Stopcodon zur Folge hat (Madsen *et al.*, 2003). Die Mutationen in *nfp5-2* und *nfp5-3* führen zu verkürzten Proteinen, in denen die Lysin-Motive und die C-terminale Kinase oder nur die C-terminale Kinase fehlen (Madsen *et al.*, 2003). In *Lotus japonicus* kommt es neben einer Formveränderung der Wurzelhaare zur physiologischen Veränderung nach Zugabe von stickstofffixierenden Bakterien (Madsen *et al.*, 2003). Die genannten Veränderungen konnten in *nfp5*-Mutanten nach Zugabe von stickstofffixierenden Bakterien nicht beobachtet werden (Madsen *et al.*, 2003).

Die genannten Kandidatengene lagern sich in phylogenetischen Studien mit *NFP5* und *LYS11* aus *Lotus japonicus*, *NFP* und *LYR1* aus *Medicago truncatula* sowie *LysM-RLK2* und *LysM-RLK11* aus *Oryza sativa* zusammen (Dr. Elena Petutschnig, Plant Cell Biology, Universität Göttingen, Deutschland). Die Funktion der Kandidatengene in der Pappel ist derzeit noch unbekannt, anhand der phylogenetischen Analysen kann vermutet werden, dass die Kandidatengene in die Ausbildung einer Symbiose mit pilzlichen Organismen involviert sind. Über CRISPR/Cas9-induzierte genetische Veränderungen in den Kandidatengenen sollten Einfach-, Doppel-, Dreifach- und Vierfach-*Knockouts* in den *NFP-like*-Kandidatengenen erzeugt werden. Die resultierenden Linien sollten auf ein verändertes

Mykorrhizierungspotential und Resistenz untersucht werden, um die Funktion der Kandidatengene in der Pappel zu bestimmen.

4.2 Kandidatengen *NFP-like2* in *P. × canescens*

Zur Analyse der durch CRISPR/Cas9-induzierten Modifikationen in den Kandidatengenen wurden die Zielsequenzen in *P. × canescens* über PCR-Amplifikation erzeugt. Es zeigte sich, dass eine Amplifikation von *NFP-like2* mit den gewählten Oligonukleotiden nicht möglich war. Zur Sequenzüberprüfung wurde die Tsai AspenDB (<http://aspendb.uga.edu/index.php/databases/spta-717-genome>) verwendet, in der die Sequenz des Pappelklons INRA 717-1B4 (*P. × canescens*) öffentlich zugänglich ist. Bei der *in silico*-Analyse in der Tsai AspenDB (<http://aspendb.uga.edu/index.php/databases/spta-717-genome>) erwies sich die für *NFP-like2* angegebene Sequenz des *P. tremula*-Allels und des *P. alba*-Allels als identisch und ebenfalls identisch zu der in Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) für *P. trichocarpa* angegebenen Sequenz. Das Ergebnis ist überraschend, da die anderen *NFP-like*-Gene Sequenzunterschiede zwischen dem *P. tremula*- und dem *P. alba*-Allel aufwiesen, *NFP-like1* war zu 97 % identisch zu dem *P. tremula*- und dem *P. alba*-Allel, *NFP-like3* und *NFP-like4* zu 98 %. Darüber hinaus waren Unterschiede zu der Sequenz von *P. trichocarpa* vorhanden: *NFP-like1* war in *P. alba*-Allel und *P. tremula*-Allel zu 3 % unterschiedlich zu *P. trichocarpa*, *NFP-like3* war im *P. alba*-Allel 3 % unterschiedlich zu *P. trichocarpa* und im *P. tremula*-Allel 4 %, *NFP-like4* war im *P. alba*-Allel 2 % unterschiedlich zu *P. trichocarpa* und im *P. tremula*-Allel 4 %. Dies lässt vermuten, dass in der Tsai AspenDB (<http://aspendb.uga.edu/index.php/databases/spta-717-genome>) die eigentlich für *P. × canescens* angegebene Sequenz von *NFP-like2* aus *P. trichocarpa* stammt.

Um zu überprüfen, ob *NFP-like2* in *P. tremula* vorhanden ist, wurde die *P. trichocarpa*-Sequenz für *NFP-like2* für eine *Blast*-Analyse in der PopGenIE Datenbank (<http://popgenie.org/blast>) verwendet. Das Ergebnis für *NFP-like2* war in den *Blast*-Analysen identisch zur *Blast*-Analyse von *NFP-like1*. Auch in der Urgi Datenbank (<https://urgi.versailles.inra.fr/Species/Forest-trees/Populus/Clone-INRA-717-1B4/>), in der ebenfalls die Sequenz des Pappelklons INRA 717-1B4 (*P. × canescens*) öffentlich zugänglich ist, die aber unabhängig von der Tsai AspenDB (<http://aspendb.uga.edu/index.php/databases/spta-717-genome>) erstellt wurde, wurden nur Sequenzen ermittelt, die denen von *NFP-like1* entsprachen.

Schlussfolgerungen

Die für *P. trichocarpa* in Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) angegebene Sequenz für *NFP-like2* konnte *in silico* weder in der genomischen Sequenz von *P. tremula* noch in zwei unabhängig voneinander erstellten genomischen Sequenzen des verwendeten Pappelklons INRA 717-1B4 (*P. × canescens*; P1) nachgewiesen werden. Experimentell konnte *NFP-like2* in P1 nicht amplifiziert werden. Alle amplifizierten PCR-Produkte entsprachen in der Sequenzanalyse *NFP-like1*. Die aufgeführten Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass *NFP-like2* in dem verwendeten *P. × canescens*-Klon P1 nicht vorhanden ist. Daher wurde im weiteren Ablauf dieser Arbeit das *NFP-like2*-Gen nicht berücksichtigt.

4.3. Vergleich der Expression von *NFP-like*-Genen in verschiedenen Pappelklonen

Den verwendeten eFP-Browsern BAR (<http://bar.utoronto.ca/efppop/cgi-bin/efpWeb.cgi>, 18.05.2019) und PopGenIE (<http://popgenie.org/eximage>, 18.05.2019) wurden Expressionsdaten zu den Kandidatengenen *NFP-like1*, *NFP-like2*, *NFP-like3* und *NFP-like4* für drei *Populus*-Arten, *P. balsamifera*, *P. tremula* und *P. trichocarpa*, entnommen. Die Kandidatengene lassen sich anhand ihrer Ähnlichkeit zueinander in zwei paraloge Paare gliedern, *NFP-like1* und *NFP-like2* bilden ein paraloges Paar, ebenso *NFP-like3* und *NFP-like4*. Bei dem paralogen Paar *NFP-like1* und *NFP-like2* waren in beiden eFP-Browsern interessanter Weise in *P. balsamifera* und *P. tremula* nur für jeweils eines der Gene Expressionsdaten vorhanden. In *P. balsamifera* war *NFP-like1* und in *P. tremula* *NFP-like2* nicht vorhanden. Bei einer Genomduplikation, wie sie in der Pappel vor etwa 65 Millionen Jahren stattgefunden hat (Tuskan *et al.*, 2006), kann die Duplikation von Genen dazu führen, dass Gene funktional redundant sind (Pickett und Meeks-Wagner, 1995). Weiterhin besteht die Möglichkeit einer Mutation in einem der beiden Gene, sodass entweder dieses Gen eine andere Funktion ausübt oder sogar funktionslos wird (Force *et al.*, 1999). Wenn die Funktion beider Gene für den Organismus identisch ist, hat dies keine Auswirkung auf den Phänotyp (Force *et al.*, 1995). Für die *in silico*-Expressionsanalysen wurden drei verschiedene Gewebe, d.h. Blatt, Sprossachse und Wurzel, betrachtet.

Beim Vergleich der Expressionsdaten ist zu bemerken, dass der verwendete *P. × canescens*-Klon P1 sowie *P. tremula* der Sektion *Populus* angehörig sind, während *P. balsamifera* und *P. trichocarpa* der Sektion *Tacamahaca* angehören. Beim Vergleich der beiden *Populus*-Klone zeigte sich, dass *NFP-like1* im Vergleich zu *NFP-like3* und *NFP-like4* am geringsten

exprimiert war. *NFP-like2* war in beiden Klonen nicht vorhanden. Bei den *Tacamahaca*-Klonen war die Expression von *NFP-like2* in *P. balsamifera* geringer als die des anderen paralogen Paares *NFP-like3* und *NFP-like4*. In *P. trichocarpa* waren *NFP-like1* und *NFP-like2* annähernd gleich stark exprimiert, wobei deren Expression über der von *NFP-like3*, jedoch unter der von *NFP-like4* lag. Anhand der Expressionsverteilung der paralogen Paare lässt sich vermuten, dass *NFP-like1* und *NFP-like2* in den untersuchten Geweben eine untergeordnete Rolle im Vergleich zu *NFP-like3* und *NFP-like4* zukommt.

Der Vergleich der Expression von *NFP-like3* und *NFP-like4* in den verschiedenen Geweben zeigte für die *Populus*-Klone, dass die Expression von *NFP-like3* über der Expression von *NFP-like4* lag. Eine Ausnahme bildete *NFP-like4* in jungem Blattgewebe, dieses war in *P. tremula* am stärksten exprimiert. In den *Tacamahaca*-Klonen zeigte sich, dass *NFP-like3* in *P. balsamifera* die höchste Expression aufwies, während in *P. trichocarpa* die höchste Expression von *NFP-like4* in den betrachteten Geweben zu verzeichnen war. Es lässt sich vermuten, dass *NFP-like3* in seiner Funktion für die *Populus*-Klone eine höhere Bedeutung aufweist als *NFP-like4*. Diese Vermutung wird von den *Tacamahaca*-Klonen nur teilweise bestätigt, da *P. trichocarpa* eine andere Expressionsverteilung zeigt. *NFP-like3* war in den Klonen *P. tremula* und *P. balsamifera* am stärksten im Wurzelgewebe exprimiert. Dies deutet auf eine wurzelspezifische Funktion hin, die mit einer Mykorrhizierung im Zusammenhang stehen kann. Jedoch kann eine andere wurzelspezifische Funktion von *NFP-like3* nicht ausgeschlossen werden. Interessanterweise wurden für Blatt- und Sprossgewebe ebenfalls hohe Expressionswerte für *NFP-like3* beobachtet, insbesondere in dem verwendeten *P. × canescens*-Klon P1 wurde die höchste Expression im Blattgewebe beobachtet. Dies lässt die Vermutung zu, dass *NFP-like3* zusätzlich eine blatt- und sprossspezifische Funktion aufweisen kann. Ebenso kann eine wurzelspezifische Funktion für *NFP-like4* nicht ausgeschlossen werden, da die Expression dem verwendeten *P. × canescens*-Klon P1 im Vergleich zu den anderen betrachteten Geweben am höchsten ist. Dies ist ebenfalls für *NFP-like4* in *P. trichocarpa* und *P. balsamifera* zu finden.

Eine Erklärung für die unterschiedliche Expression von *NFP-like3* und *NFP-like4* in den verschiedenen Arten und Geweben kann darin begründet sein, dass eines der beiden Gene die ursprüngliche Funktion behält, während das andere eine neue Funktion übernimmt (Panchy *et al.*, 2016). In so einem Fall würden bei resultierender erhöhter Fitness beide Gene nach einer Genduplikation erhalten bleiben (Panchy *et al.*, 2016). Anhand dessen ließe sich ebenfalls erklären, warum in *P. tremula*, *P. balsamifera* und dem verwendeten *P. × canescens*-Klon P1 nur eine Kopie von *NFP-like1* bzw. *NFP-like2* vorliegt. Die zweite Kopie war in ihrer

Funktion identisch, führte zu keiner erhöhten Fitness des Organismus und war dementsprechend redundant.

Schlussfolgerungen

Anhand der *in silico*-Analyse lässt sich vermuten, dass *NFP-like1* und *NFP-like2* keine wurzelspezifische Funktion zukommt. Die Expressionsdaten zu *NFP-like3* und *NFP-like4* zeigen in den unterschiedlichen Pappelklonen unterschiedliche Expressionsstärken in den untersuchten Geweben, sodass abschließend nur vermutet werden kann, dass *NFP-like3* für eine wurzelspezifische Funktion von höherer Bedeutung ist als *NFP-like4*. Jedoch kann eine wurzelspezifische Funktion von *NFP-like4*, das mutmaßlich zur Ausbildung einer Mykorrhizierung führen kann, nicht ausgeschlossen werden. Weiterhin kann eine blatt- und sprossspezifische Funktion von *NFP-like3* gemutmaßt werden.

4.4 CRISPR/Cas9-vermittelte genetische Modifikation von *NFP-like*-Genen

Anhand von CRISPR/Cas9 sollten in den *NFP-like*-Kandidatengenen Modifikationen an zuvor gewählten Zielregionen der gDNA durch Doppelstrangbrüche und anschließender zelleigener Reparatur erzeugt werden, die eine Veränderung des Leserasters bedingen können. Durch die Verschiebung des Leserasters können vorzeitige Stopcodonen entstehen, die zum Abbruch der Proteinsynthese führen, sodass kein funktionales Protein erzeugt wird. Über einen Mechanismus, der als *Nonsense mediated mRNA decay* (NMD) bezeichnet wird, werden mRNA-Moleküle mit vorzeitigem Stopcodon erkannt und abgebaut, sodass eine Anreicherung von verkürzten, für die Zelle schädlichen Proteinen, verringert wird (Maquat, 2005). Dieser Umstand wird sich bei der Modifikation durch CRISPR/Cas9 zu Nutze gemacht. Die modifizierten Zielgene sollten durch vorzeitige Stopcodonen und den Abbau der verkürzten resultierenden mRNA bedingen, dass ein *Knockout* des Zielgenes vorliegt. Anhand eines *Knockouts* kann die mögliche Funktion eines Proteins analysiert werden. Die erzeugten transgenen Linien wurden auf eine durch CRISPR/Cas9-induzierte Modifikation untersucht. Ein Augenmerk wurde insbesondere auf die Modifikation auf Transkript-Ebene gelegt, da diese entscheidend für das zu synthetisierende Protein ist. Die Cas9-Nuklease und die verwendeten gRNAs wurden über Agrobakterien-vermittelte Transformation in den Organismus eingebracht. Zur Modifikation wurde *NFP-like1* einzeln sowie *NFP-like3* und *NFP-like4* als doppelte Modifikation und, in Kombination, alle drei Kandidatengene gewählt. Die Analyse der Modifikationen in den *NFP-like*-Genen erfolgte über DNA- und RNA-Isolation, PCR-Amplifikation und Sanger-Sequenzierung.

4.4.1 Effizienz der gewählten gRNAs

Anhand der nachgewiesenen Modifikationsanzahl an den Zielregionen der Kandidatengene der aus den Transformationen erzeugten transgenen Linien zeigte sich, dass die verwendeten gRNAs sich in ihrer Modifikationseffizienz unterschieden, sodass diese wie folgt abstufig zu gliedern waren:

gRNA1 > gRNA3 > gRNA4 > gRNA2

Zahlreiche Faktoren können die Effizienz des gRNA-CRISPR/Cas9-Komplexes beeinflussen, wobei insbesondere die Struktur der gRNA eine essentielle Rolle spielt (Doench *et al.*, 2014; Wong *et al.*, 2015). Die Cas9-Nuklease ist ohne gebundene gRNA inaktiv (Song *et al.*, 2016). Sobald eine gRNA an die Cas9-Nuklease bindet und sich ein Komplex zwischen gRNA und Cas9 ausbildet, verändert sich die Konformität der Cas9-Nuklease stark (Doudna und Charpentier, 2014). Die aus 20 Nukleotiden bestehende gRNA geht mit der tracrRNA eine definierte Struktur ein (Wong *et al.*, 2015). Die Nukleotide 18–20 bilden die *Seed*-Region der gRNA aus, die direkt an der PAM-Erkennungssequenz zur Erkennung des Targets notwendig ist (Wong *et al.*, 2015). Neben einer ungepaarten *Seed*-Region beeinträchtigen die ungepaarten Nukleotide 51–53 der tracrRNA die Sekundärstruktur der gRNA, sodass ein *Stem-Loop* (Nukleotide 21–50) gebildet wird (Wong *et al.*, 2015). Nicht funktionsfähige RNAs waren mit der *Seed*-Region an die 51–53 Nukleotide der tracrRNA gebunden. Liang *et al.* (2016) berichteten, dass die Sekundärstruktur der gRNA vier *Loops* erzeugt, die als *BAR-Stem-Loop* (Nukleotide 21–50), *Stem-Loop 1* (Nukleotide 51–67), *Stem-Loop 2* (Nukleotide 68–81) und *Stem-Loop 3* (82–97) bezeichnet werden. Der *Stem-Loop 1* zeigte keine Auswirkung auf die Effizienz der gRNA, jedoch waren die anderen *Loops* für die Effizienz der gRNA in Pflanzen essentiell. Ein zu hoher oder niedriger GC-Gehalt führt zu ineffizienten gRNAs (Doench *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014), Gagnon *et al.* (2014) zeigten, dass ein GC-Gehalt von über 50 % für die Effizienz der gRNA in Zebrafisch optimal ist. In Pflanzen hingegen wird ein GC-Gehalt von 30–80 % mit effektiven gRNAs toleriert (Liang *et al.*, 2016). Positionseffekte einiger Nukleotide wurden mit Effizienz der gRNAs in tierischen Zellen beobachtet (Doench *et al.*, 2014). Die PAM-Erkennungssequenz (NGG), die für die Cas9-Nuklease als Erkennungssequenz dient, hat ein variables Nukleotid. Doench *et al.* (2014) beobachteten, dass ein Cytosin als variables Nukleotid favorisiert wird und ein Thymin zu einer verminderten Effizienz führte. Weiterhin ist ein Guanin an Position 20 direkt nach der PAM-Erkennungssequenz bevorzugt (Gagnon *et al.*, 2014), während ein Cytosin einen negativen Effekt zeigt (Doench *et al.*, 2014). Ein Cytosin an Position 16 ist vorteilhaft und ein Guanin nicht, ebenso wird ein Cytosin an Position 3 bevorzugt. Wang *et al.* (2014)

beschrieben, dass sich Purinbasen als letzte vier Nukleotide der gRNA positiv auf die Effizienz der gRNAs auswirkte. Liang *et al.* (2016) konnten in Pflanzen keine bevorzugten Nukleotide beobachten. Anhand der dargestellten strukturellen Eigenschaften der gRNAs zeigte die gRNA1 die meisten zutreffenden Eigenschaften. Die *Seed*-Region war nicht an die tracrRNA gebunden und mit Ausnahme des *Stem-Loops* 1 konnten alle *Loops* erzeugt werden. Weiterhin waren drei der vier letzten Basen Purinbasen und der GC-Gehalt entsprach 36 %. Der durch CRISPR/Cas9 modifizierte Strang war der transkribierte Strang, der nach Wang *et al.* (2014) als eingeschränkt effizient zu werten war.

Die Analyse der Sekundärstrukturen erfolgte mittels des bioinformatischen *Webtools RNAfold* (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>; 27.04.2020, Gruber *et al.*, 2008) unter Verwendung des Andronescu-Modells (Andronescu *et al.*, 2007). Die Darstellung der Sekundärstruktur anhand der minimal aufgewendeten Energie (*minimum free energy*: MFE) wurde unter Verwendung des Algorithmus von Zucker *et al.* (1981) umgesetzt. Anhand der im Abschnitt 6.3 in Abbildung 6.3 dargestellten Sekundärstruktur wurden strukturelle Eigenschaften der verwendeten gRNAs analysiert. Da es sich bei der gRNA1 um die gRNA mit den meisten Modifikationen handelte, konnte der von Liang *et al.* (2016) beobachtete GC-Gehalt mit 30–80 % bestätigt werden. Die verwendete gRNA1 wies lediglich einen GC-Gehalt von 38 % auf und war in ihrer Effizienz deutlich über der gRNA3 mit einem GC-Gehalt von 52 %, sodass dieses nicht als einschließliches Kriterium zu werten ist. Weiterhin war in der gRNA1 die *Seed*-Region im Vergleich zu den anderen gRNAs frei zugänglich, sodass dies als eine wichtige strukturelle Eigenschaft zu werten ist. Die Notwendigkeit des *Stem-Loops* 2 kann für die gRNA1 nicht bestätigt werden, da die gRNA1 trotz seines Fehlens die höchste Effektivität zeigte. Zu bemerken ist, dass in der gRNA1 drei der vier letzten Basen Purinbasen waren, die einen positiven Effekt auf die Effizienz zeigen sollten. Die verwendete gRNA2 zeigte keine Effektivität, obwohl alle *Stem-Loops* erzeugt werden konnten und der Zielstrang, der nicht-transkribierte Strang war. Hervorzuheben ist, dass die letzten vier Nukleotide ausschließlich Pyrimidinbasen waren. Die gRNA3 und gRNA4 wurden als Targets in *NFP-like3* und *NFP-like4* gewählt. Beide gRNAs unterschieden sich insofern, dass in *NFP-like3* der nicht-transkribierte und in *NFP-like4* der transkribierte Strang zur Modifikation diente. Eine geringere Modifikation wurde in *NFP-like4* beobachtet, sodass die in Wang *et al.* (2014) beobachtete verminderte Effizienz des transkribierten Stranges bestätigt werden konnte. Ebenso die Notwendigkeit von Purinbasen konnte bestätigt werden, die gRNA3 und gRNA4 wiesen beide zwei Purinbasen auf. In gRNA3 konnte der *Stem-Loop* 3 nicht geformt werden und dennoch war gRNA3 effektiver als gRNA4, in der bis auf

den *Stem-Loop* 1 alle *Loops* geformt werden konnten. Die Annahme von Liang *et al.* (2016), dass lediglich auf dem *Stem-Loop* 1 verzichtet werden kann, konnte demnach nicht bestätigt werden. Ebenso scheint eine gepaarte *Seed*-Region nicht zum vollständigen Verlust der Effektivität zu führen. Die gRNA3 ist vollständig an die Nukleotide 51–53 gepaart und dennoch effektiver als die gRNA4, die teilweise an diese Nukleotide gebunden ist.

Schlussfolgerungen

Anhand der Sekundärstruktur der gewählten gRNAs lässt sich die unterschiedliche Modifikationsrate in den verschiedenen erzeugten Linien erklären. Lediglich die gRNA1, die die höchste Effizienz zeigte, wies die höchste Anzahl an Purinbasen auf, sodass deren Notwendigkeit bestätigt wird. Die Auswirkung einer gänzlich ungepaarten *Seed*-Region kann ebenfalls anhand der verwendeten gRNAs bestätigt werden, jedoch sind teilweise gepaarte *Seed*-Regionen sowie gänzlich gebundenen *Seed*-Regionen nicht mit einer funktionsunfähigen gRNA zu korrelieren, sie scheinen jedoch eine Reduktion der Effizienz zu bewirken. Ebenso scheint der zu modifizierende Strang eine Rolle auf die Effizienz der gRNA zu spielen. Eine gesteigerte Effizienz, die durch bestimmte Nukleotide an einzelnen Positionen hervorgerufen wird, konnte für die verwendeten gRNAs nicht bestätigt werden.

4.4.2 Modifikation von *NFP-like*-Kandidatengen

Anhand phylogenetischer Analysen zeigte sich, dass die Kandidatengene *NFP-like1*, *NFP-like2*, *NFP-like3* und *NFP-like4* zu den Genen *NFP5* und *LYS11* aus *Lotus japonicus*, *NFP* und *LYR1* aus *Medicago truncatula* sowie *LysM-RLK2* und *LysM-RLK11* aus *Oryza sativa* ähnlich sind (Dr. Elena Petutschnig, Plant Cell Biology, Universität Göttingen, Deutschland). *NFP-like3* und *NFP-like4* sind in ihrer Struktur ähnlich zu *LysM-RLK11* aus *Oryza sativa*, während *NFP-like1* und *NFP-like2* ähnlicher zu *NFP5* und *LYS11* aus *Lotus japonicus* und *NFP* und *LYR1* aus *Medicago truncatula* sind. *NFP5* aus *Lotus japonicus* scheint in die Wurzelmorphologie bei der Symbiose mit stickstofffixierenden Bakterien involviert zu sein (Madsen *et al.*, 2003). *LYS11* ist das am nächsten verwandte Paralog zu *NFP5* aus *Lotus japonicus* und ist im Gegensatz zu *NFP5*, das in den Knöllchen und den Wurzeln exprimiert ist, in den oberirdischen Geweben exprimiert (Lohmann *et al.*, 2010). Rasmussen *et al.* (2016) vermuteten, dass *LYS11* bei der Ausbildung der arbuskulären Symbiose induziert wird und die späteren Stadien der arbuskulären Symbiose und deren Interaktion mit der Pflanze genau ausrichtet. In *Medicago truncatula* spielt *NFP* eine entscheidende Rolle in der NOD-Faktor Erkennung in der frühen Ausbildung der Symbiose (Amor *et al.*, 2003), *LYR1* das

Paralog zu *NFP* ist während Kolonisierung der Mykorrhiza stark exprimiert (Young *et al.*, 2011). Obwohl die Pappel nicht zu den Leguminosen gehört, konnten über phylogenetische Studien *NFP5*- und *LYS11*-ähnliche Gene nachgewiesen werden (Zhang *et al.*, 2007). In *Medicago* ist *LYR1* während der Ausbildung einer arbuskulären Symbiose mit *Glomus versiforme* oder *Glomus intraradices* (Gomez *et al.*, 2009) an kolonisierten Wurzeln hochreguliert. Auf Grund der genannten Funktion der *NFP-like*-Gene in *Medicago* und *Lotus* wurde vermutet, dass die *NFP-like*-Kandidatengene in Pappel eine Funktion bei der Ausbildung einer Symbiose mit mykorrhizierenden Pilzen innehaben können. Anhand von Expressionsstudien wurde weiterhin vermutet, dass eine Funktion bei der Abwehr gegen pilzliche Schadorganismen im oberirdischen Bereich der Pflanze für die *NFP-like* Kandidatengene gegeben sein könnte.

Zur Funktionsanalyse der *NFP-like*-Kandidatengene sollten diese über CRISPR/Cas9 modifiziert werden. Hierzu wurden Targets in den Kandidatengen gewählt, um die paralogen Paare gleichzeitig zu modifizieren. Für die Modifikationen wurden von der Firma DNA Cloning Service e.K. (Hamburg, Deutschland) zwei verschiedene Transformationsvektoren erstellt, die in den Pappelklon INRA 717-1B4 (*P. × canescens*; P1) transformiert wurden.

Modifikation in *NFP-like1*

Die durch Transformation erzeugten transgenen Pappellinien wurden auf die vollständige Integrität der T-DNA überprüft. Insgesamt konnten aus den resultierenden putativ transgenen Linien 111 Regenerate zur Analyse einer durch CRISPR/Cas9-induzierten Modifikation an den gewählten Targetbereichen verwendet werden.

In der Sequenzanalyse zeigte sich, dass mit den verwendeten Oligonukleotiden nur das Alba-Allel in den genetisch modifizierten Linien amplifiziert wurde. Infolge der Oligonukleotide, die auf der *P. trichocarpa*-Sequenz erzeugt wurden, waren Sequenzunterschiede zur *P. tremula* und *P. alba*-Sequenz vorhanden (Tabelle 4.1), die die Ergebnisse erklären können.

Tabelle 4.1: Sequenzanalyse der Oligonukleotide zur *NFP-like1* Amplifikation

Angegeben sind die verwendeten Oligonukleotide zur Amplifikation von *NFP-like1* sowie die Sequenzen des Tremula- und Alba-Allels. Rot hervorgehoben sind die Unterschiede der Oligonukleotidsequenz zu den Allelen. MM: *Mismatch*.

Sequenz 5' → 3'

Alba	TTTCCACACAAGCTCTTCTTCTC	1 MM
Tremula	TTTCCACACAAGCTCTACTTCTC	2 MM
#2257	TTTCCACACAGGCTCTTCTTCTC	

Alba	GTCCTGTAAGTGCCCTTCAAAAC	2 MM
Tremula	GTTCTGTAAGTGCCCTTCAAAAC	1 MM
#2258	GTTCTGTAAGTGCCCTTCAAATAC	

Alba	AAAATCAATGGCAGGGTCTTGG	1 MM
Tremula	AAAATCAATGGTCGGGTCTTGG	1 MM
#2259	AAAATCAATGGCCGGGTCTTGG	

Alba	GGACATCTGGGATGGAAACAG	0 MM
Tremula	GGACATCTGGGATGGAAACAG	0 MM
#2260	GGACATCTGGGATGGAAACAG	

Die Analyse der Modifikationen im gRNA1-Target erfolgte dementsprechend zunächst lediglich für das Alba-Allel. Insgesamt konnten 46 % (51/111) der Linien auf Grund heterogener Chromatogramme bei der Amplifikation des Alba-Allels als Chimären identifiziert werden. Die Mehrzahl der regenerierten Pflanzen waren demnach als Chimären einzustufen. Ding *et al.* (2020) beobachteten ebenfalls, dass sie Mehrzahl an modifizierten Linien nach einer CRISPR/Cas9-Modifikation des *PdbPDS1*-Gens in der Hybridpappel Shanxin (*P. davidiana* × *P. bolleana*) als Chimären zu werten waren. Anhand einer erneuten Reeneration konnte die Anzahl an homozygoten Linien erhöht werden (Ding *et al.*, 2020). Im Alba-Allel wurde bei 36 % (40/111) der Linien eine Einzelmodifikation nachgewiesen. Die Einzelmodifikationen äußerten sich in für Pflanzen übliche Modifikationen von Deletion/Insertion eines Adenin-Nukleotids sowie kurzen Deletionen von bis zu 5 bp (Bortesi *et al.*, 2016). Die Linie N481-97 zeigte eine Modifikation in Form einer größeren Insertion. Bei der Analyse ausgewählter Linien für die Modifikation des Tremula-Allels wurden

ähnliche Modifikationen nachgewiesen. Lediglich eine Linie erwies sich als homozygot modifiziert. Die verbliebenen sechs Linien waren heterozygot biallelisch.

In den ausgewählten Linien integrierte die T-DNA nach Southern-Blot-Analysen bis zu sechsmalig im Genom. Ebenso wurde teilweise eine abweichende Anzahl der Integrationen für die zwei spezifischen Sonden, die jeweils an der *right border* bzw. an der *left border* lokalisiert waren, beobachtet. Das an der *left border* lokalisierte *hph*-Gen wurde im Southern-Blot über eine spezifische Sonde in vier von sieben Linien häufiger detektiert als das an der *right border* liegende *Cas9*-Gen. Eine Möglichkeit der häufigeren Detektion des *hph*-Gens könnte ein Abbruch der *left border* sein, die bei der Transformation von Hybridpappeln und Pappeln weniger konserviert ist als die *right border* (Kumar und Fladung, 2002).

Über die TAIL-PCR konnten die vermeintlichen Integrationen der T-DNA bestimmt werden. Da bis zu sechs Integrationen für die T-DNA nachgewiesen wurden, konnten für drei der sieben Linien in der TAIL-PCR mehrere Loci beobachtet werden. Die T-DNAs integrierten sowohl intergenisch als auch in Potri.009G049100.1. Interessanterweise werden bei der Integration der T-DNA scheinbar bestimmte Bereiche im Genom bevorzugt. Brunaud *et al.* (2002) beobachteten, dass in *Arabidopsis thaliana* die T-DNA bevorzugt in T-reichen Sequenzen integrierte, die sich meistens vor Startcodonen oder in Introns befanden. Dies erklärt die Integration in intergenischen Bereichen. Der Nachweis der Integrationen in Potri.009G049100.1 kann begründet sein, dass für die Aufreinigung PCR-Fragmente gewählt wurden, die im Agarosegel in der gleichen Höhe liefen.

Modifikation in *NFP-like3* und *NFP-like4*

Zur simultanen Modifikation von *NFP-like3* und *NFP-like4* wurden insgesamt vier Transformationsansätze durchgeführt, da bei der Regeneration viele putativ transgene Regenerate erzeugt wurden, in denen die T-DNA nicht vollständig integriert war. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Selektion mittels des verwendeten Kanamycins nur unzureichend funktionierte, da mutmaßlich die zunächst verwendete Konzentration des Kanamycins zu gering war. Zhang *et al.* (2001) berichteten, dass die Kallusentwicklung von Hypokotyl- oder Kotyledonen-Explantaten von *Gossypium hirsutum* L. bei einer Kanamycin-Konzentration von 10 mg/L nicht beeinflusst war, bei einer Konzentration von 20 mg/L bis 40 mg/L teilweise inhibiert war und bei einer Konzentration ab 60 mg/L vollständig unterdrückt war. Weiterhin ist das *nptII*-Gen an der weniger konservierten *left border* lokalisiert und neigt eher zu einem Abbruch bei der Integration der T-DNA (Kumar und Fladung, 2002), sodass dies ein Grund für die vielen falsch positiven Regenerate sein könnte

4 Diskussion

In den positiv getesteten Regeneraten konnten wenige Modifikationen nachgewiesen werden, dass auf die Effizienz der verwendeten gRNAs zurückzuführen war (4.3.1). Die beobachteten Modifikationen in *NFP-like3* und *NFP-like4* waren in den meisten Fällen eine Insertion eines Adenin-Nukleotids und bestätigen die von Bortesi *et al.* (2016) beschriebene bevorzugte Modifikation der Insertion/Deletion von einzelnen Adenin- bzw. Thymin-Nukleotiden.

In einigen modifizierten Linien wurden drei Amplikons bei der Amplifikation beider Allele erzeugt. Zwei der Amplikons konnten eindeutig jeweils einem Allel zugeordnet werden, jedoch war das größere Amplikon zumeist eine Mischung aus beiden Allelen. Bhattacharya und Van Meir (2019) beobachteten bei Hetero- und Homoduplexstudien von CRISPR/Cas9 modifizierten Mäusen, dass entgegen der Erwartung drei Banden im Agarosegel vorhanden waren und argumentierten, dass es sich bei diesen Modifikationen um komplizierte Mosaikmutationen handeln könnte. Ähnliches kann daher für die Linien mit mehrfachen Amplikons spekuliert werden.

Eine weitere Möglichkeit für die scheinbar identischen zwei unterschiedlich großen Amplikons ist eine Duplikation der Integration. Die Target-Sequenzen befinden sich zweimalig im Gen von *NFP-like3*. Das gRNA3-Target und gRNA4-Target befinden sich in dem ersten Intron sowie im zweiten Exon des Gens. Ein zusätzliches Amplikon könnte auf eine Modifikation im Intron zurückzuführen sein. Erstaunlicher Weise tritt der Sonderfall mit mehreren Amplikons nur in CRISPR/Cas9 modifizierten transgenen Linien auf und konnte in dem nicht-modifizierten Kontroll-Klon P1 nicht beobachtet werden.

Zur Analyse einer möglichen Modifikation im Intronbereich wurden Oligonukleotide verwendet, die den annotierten Bereich des ersten Introns amplifizieren sollten. In den verwendeten Datenbanken PopGenIE (<http://popgenie.org/blast>), Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) und der Tsai AspenDB (<http://aspendb.uga.edu/index.php/databases/spta-717-genome>) war *NFP-like3* unterschiedlich annotiert. Über Oligonukleotide, die den Intronbereich nach der Annotation aus der Tsai AspenDB (<http://aspendb.uga.edu/index.php/databases/spta-717-genome>) und Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) amplifizieren sollten, konnte kein Amplikon erzeugt werden, sodass mutmaßlich das annotierte Intron in dem verwendeten Kontroll-Klon P1 nicht vorhanden war. In PopGenIE (<http://popgenie.org/blast>) war die Intronsequenz vor *NFP-like3* vorhanden und mit speziell an die in PopGenIE (<http://popgenie.org/blast>) annotierten Sequenz angepassten Oligonukleotiden konnte ein Fragment erzeugt werden, das jedoch einem Teilfragment von *NFP-like4* entsprach.

Für die Analyse der T-DNA-Integrationszahl wurden vier Linien der N482-Transformation untersucht. Die T-DNA integrierte bis zu dreimalig im Pappelgenom. Die Anzahl der Integrationsorte für die an den Randbereichen liegenden Gene, die für die Analyse als Sondenbereiche dienten, war für eine der Linien abweichend. Eine Möglichkeit einer häufigeren Detektion eines Randbereiches kann ein Abbruch der *left border* sein, die bei der Transformation von Hybridpappeln und Pappeln weniger konserviert ist als die *right border* (Kumar und Fladung, 2002).

In der TAIL-PCR wurde eine Linie analysiert, bei der als Integrationsort einerseits Potri.017G145800.1 wie auch Potri.009G049100.1 nachgewiesen werden konnte, obwohl über Southern-Blot-Analysen nur ein Integrationsort nachgewiesen wurde. Beim Alignment von Potri.017G145800.1 und Potri.009G049100.1 konnten kaum Sequenzähnlichkeiten nachgewiesen werden. Die Analyse mittels TAIL-PCR zum Nachweis der Integrationen birgt Schwierigkeiten, sobald die T-DNA mehrfach in das Genom integriert ist, eine komplexe Anordnung der T-DNA im Genom vorliegt, ein Teil des Vektorrückgrades inseriert wurde, eine chromosomale Verdopplung oder Neuordnung vorliegt oder eine Kombination aus mehreren genannten Faktoren (Nath Radhamony *et al.*, 2005). Mutmaßlich ist das durch Restriktion erzeugte Fragment der T-DNA im pflanzlichen Genom für beide Integrationen gleich groß, sodass im Southern-Blot nur ein Fragment detektiert wurde.

Dreifachmodifikation von *NFP-like1*, *NFP-like3* und *NFP-like4*

Zur genetischen Modifikation aller gewählten Kandidatengene wurde *P. × canescens* (P1) mit den Transformationsvektoren A259 und A260 transformiert. Die Selektion erfolgte über die Zugabe von Antibiotika in Abhängigkeit der transformierten Resistenzkassetten. Die T-DNA des Vektors A259 enthielt das *hph*-Gen, die T-DNA des Vektors A260 das *nptII*-Gen. Aus der Transformation N483 waren fünf von 17 Linien vorhanden, in denen beide T-DNAs erfolgreich integriert waren, während aus der N484-Transformation 19 von 23 Linien für die Analysen gewonnen werden konnten. Die bereits für die Einzeltransformation beobachteten Modifikationen waren auch in der Doppeltransformation zu finden. Für *NFP-like1* konnten Einzelnukleotidmodifikationen und Deletionen von bis zu vier Nukleotiden beobachtet werden und entsprachen damit den in Pflanzen üblich nachweisbaren Modifikationen (Bortesi *et al.*, 2016). Lediglich eine Linie der N484-Transformation wies eine Deletion von 20 Nukleotiden auf.

Für die Modifikation in *NFP-like3* wurden, wie bereits für die Transformation zur Modifikation von *NFP-like3* und *NFP-like4* beobachtet, Linien erzeugt, die bei der PCR-

Amplifikation mehrere Fragmente im Agarosegel zeigten. Diese Linien wiesen zudem größere Deletionen in den Targetbereichen auf. Die weiteren Modifikationen in *NFP-like3* beschränkten sich auf Einzelnukleotidinsertionen oder -deletionen. In *NFP-like4* waren ebenfalls nur Einzelnukleotidinsertionen zu finden.

Zum Nachweis der Anzahl der T-DNA-Integrationen wurden Southern-Blot-Analysen durchgeführt. In zwei von vier Linien entsprach die Anzahl der detektierten Cas9-Fragmente, die in beiden Vektoren vorhanden war, der detektierten Anzahl an Fragmenten der Resistenzkassetten. In der TAIL-PCR-Analyse zum Auffinden des genomischen Integrationsorts der T-DNA konnte für keine der ausgewählten Kandidatenlinien ein Integrationsort detektiert werden. Wu *et al.* (2015) berichteten, dass in TAIL-PCR-Analysen in *Arabidopsis* lediglich einen Anteil von 39 % der DNA-Fragmente aus Vektor-DNA und *Arabidopsis*-DNA bestanden, weiterhin enthielten 13 % ausschließlich *Arabidopsis*-DNA. Die restlichen 48 % der DNA-Fragmente bestanden ausschließlich aus T-DNA oder Vektor-DNA (Wu *et al.*, 2015). In einigen durch TAIL-PCR erzeugten PCR-Fragmenten konnte ausschließlich Vektor-DNA nachgewiesen werden. Zum Nachweis der T-DNA Integrationen in das Genom wären Sequenzierungen des gesamten Genoms ausgewählter Linien vorteilhaft, um den genauen Integrationsort sowie die Anzahl der T-DNA Integrationen bestimmen zu können.

Schlussfolgerungen

Die Modifikationsanalyse, der durch Transformation erzeugten Einzel-, Doppel- und Dreifachmodifikationen der *NFP-like*-Kandidatengene ergab, dass überwiegend Einzelmodifikationen und Insertionen bzw. Deletionen von bis zu fünf Nukleotiden an den Schnittstellen der Cas9-Nuklease nachgewiesen werden konnten. Für einzelne Linien wurden jedoch auch größere Deletionen oder Insertionen nachgewiesen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass für *NFP-like1* modifizierte Linien überwiegend chimäre Pflanzen entstanden sind. Die Transformation und Erzeugung transgener modifizierter Linien, die eine Modifikation in einem, zwei und drei der Kandidatengene aufwiesen, war erfolgreich. Die Integrationsanzahl überstieg für die untersuchten Linien mit bis zu sechs Integrationen das angestrebte Ziel von Einfachintegrationen. Die Analyse der T-DNA Integrationsorte ergab nicht für alle Linien ein auswertbares Ergebnis.

4.4.3 Modifikationsunterschiede auf genomischer und transkriptioneller Ebene

Die auf genomischer Ebene beobachteten Modifikationen der Zielgene sollten auch in den daraus generierten Transkripten vorhanden sein. Um zu überprüfen, dass die auf gDNA-Ebene nachgewiesenen Modifikationen auf RNA-Ebene vorhanden sind, wurde aus Blatt- und Wurzelgewebe transgener Kandidatenlinien RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Bei der Analyse der cDNA aus Blatt- und Wurzelgewebe konnten für die Kandidatenlinien zur Modifikation an den Modifikationspositionen teilweise unterschiedliche Modifikationen nachgewiesen werden. Dies kann auf Fehler bei der Umschreibung von RNA in cDNA zurückzuführen sein. Die Linien, die sich in der aus cDNA abgeleiteten RNA zur gDNA unterschieden, waren entweder auf gDNA bereits als chimäre identifiziert worden oder auf cDNA-Ebene als chimäre zu werten. Erklärbar können die Ergebnisse sein, in dem bei der reversen Transkription in einem der Allele Fehler erzeugt wurden, sodass für eines der Allele zwei Versionen vorlagen. Für *NFP-like3* hingegen sind zwei Transkriptvarianten annotiert, Potri.008G160600.1 und Potri.008G160600.2 (Tsai AspenDB <http://aspenDB.uga.edu/index.php/databases/spta-717-genome>), die Transkriptvariante 1 ist für beide Allele mit 66 Nukleotiden am 5'-Ende länger als die Transkriptvariante 2. Beide Transkriptvarianten sind mit Ausnahme der 66 Nukleotide am 5'-Ende identisch, sodass man über PCR-Amplifikation zwar die Sequenz der Transkriptvariante 1 von der Transkriptvariante 2 trennen könnte, jedoch nicht ausschließlich die Transkriptvariante 2 amplifizieren kann. Auf Grund dessen könnte es teilweise zu unterschiedlichen Modifikationen in *NFP-like3* bei der Sequenzanalyse gekommen sein.

Obwohl bei diesen beiden Varianten eine identische Modifikation zu erwarten wäre, kann mutmaßlich durch die starke Sequenzidentität des ersten Introns zum zweiten Exon ein Grund für die unterschiedlichen Modifikationen auf cDNA-Ebene sein. Mutmaßlich wurde *NFP-like3* im Intron und Exon modifiziert und auf Grund der Modifikation erfolgte ein alternatives Spleißen, sodass das Intron als Exon angesehen wird und das Exon nicht. Mou *et al.* (2017) berichteten von teilweise Exon überspringendem Spleißen in CRISPR/Cas9 modifizierten Lungendrüsenkrebszellen in der Maus. Durch das alternative Spleißen kam es in den Zellen lediglich zu einer Reduktion des gewünschten Gens und nicht wie erwartet zu einem durch ein vorzeitiges Stopcodon-vermittelten Abbau der RNA (Mou *et al.*, 2017). Dies könnte erklären, warum auf RNA-Ebene eine andere Modifikation zu finden war. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass bei der PCR-Amplifikation auf gDNA beide Bereiche, die des ersten Introns und des zweiten Exons, die in ihrer Sequenzidentität sehr ähnlich sind,

amplifiziert wurden. Auf RNA-Ebene ist das Intron auf Grund des Spleißens nicht mehr vorhanden, sodass nur noch die Modifikation des Exons betrachtet wird.

Schlussfolgerungen

Zusammenfassend wurde für einige ausgewählte Linien eine andere Modifikation auf RNA- als auf gDNA-Ebene beobachtet. Da die RNA als Grundlage für die Prozessierung zum Protein dient, sind die Modifikationen auf RNA für das entstehende Protein entscheidend. Bei einer Modifikation in Form einer Deletion von zwei Nukleotiden auf gDNA-Ebene kann man von einer Veränderung des Leserasters ausgehen, das mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Erzeugung eines Stopcodons führt oder ein gänzlich anderes Protein erzeugt. Befindet sich auf RNA-Ebene eine weitere Modifikation, in der vermutlich ein weiteres Nukleoid deletiert ist, sodass ein ganzes Triplet fehlt, muss die Auswirkung auf das Protein möglicherweise nicht folgenschwer sein, sofern es sich in einem nicht-essentiellen Bereich des Proteins befindet. Insbesondere bei Genen, die keinen extremen Phänotyp auslösen, sodass die auf gDNA beobachtete Modifikation mit beispielsweise einem Albinophänotyp deutlich sichtbar ist (Fan *et al.*, 2015), ist die Sequenzierung der cDNA von Bedeutung, um die Linien zu selektieren, in denen ein *Knockout* generiert wurde.

4.4.4 Proteinvorhersage

Die Analyse, ob die auf gDNA und RNA beobachteten Modifikationen in einem funktionsfähigen Protein resultierten, erfolgte *in silico*. Mittels des *ExPasy Translate Tools* (https://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna_aa) wurde die Transkriptsequenz in eine Aminosäuresequenz übersetzt. Neben dem Nachweis eines vorzeitigen Stopcodons wurde analysiert, ob ein funktionsfähiges Protein über ein alternatives Leseraster erzeugt werden kann. Da ein Triplet für eine Aminosäure kodiert, sind in Leserichtung drei Leseraster möglich. Aber auch die in entgegengesetzter Richtung vorhandenen drei Leseraster könnten zur Bildung eines Proteins führen. Trotz eines möglichen Stopcodons auf dem „normalen“ Leseraster könnte ein funktionsfähiges Protein auf einem anderen Leseraster entstehen. Daher wurden die resultierenden Aminosäuresequenzen unter Verwendung der *SMART Protein Prediction* (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?GENOMIC=1) berechnet.

Die Modifikationen von *NFP-like1* in der Einzelmodifikation sowie die der Dreifachmodifikation aller Kandidatengene ergab, dass mit Ausnahme der Linie N481-44, die eine Deletion von drei Nukleotiden aufwies, vorzeitige Stopcodonen erzeugt wurden. Anhand

4 Diskussion

der Proteinlänge des nicht-modifizierten Gens konnte bei den modifizierten Linien die Gesamtlänge des translatierbaren Proteins bestimmt werden. Die Gesamtlänge der modifizierten Proteine betrug 14,5–22,9 % des nicht-modifizierten Gens. Die mRNAs, die bei 20 %, 40 % oder 60 % ein vorzeitiges Stopcodon aufwiesen, sind instabil und werden abgebaut (Isshiki *et al.*, 2001), sodass vermutet werden kann, dass für *NFP-like1* kein Protein in den transgenen Linien erzeugt wird. Über den Mechanismus der *nonsense mediated RNA decay* (NMD) werden mRNAs mit vorzeitigen Stopcodonen, die zu verkürzten und für die Zelle toxischen Proteinen führen können abgebaut, sodass deren Anteil in der Zelle reduziert wird (Maquat, 2005). Das vorzeitige Stopcodon in den transgenen Linien befindet sich an verschiedenen Positionen, das späteste Stopcodon war bei Aminosäure 142 des Proteins lokalisiert. Die Transmembran-Region des Proteins befand sich bei Aminosäure 246–268 und die Kinase-Domäne bei Aminosäure 339–586, sodass der Abbruch der Proteinsynthese vor der Transmembran-Region und der katalytischen Domäne des Proteins erzeugt wird. Anhand dessen kann bei Synthese eines Proteins davon ausgegangen werden, dass kein funktionales Protein erzeugt wird.

Die Modifikation von *NFP-like3* wurde für beide möglichen Transkriptvarianten betrachtet. Es ergaben sich in der Doppelmodifikation zwei zu analysierende Linien. Die Linie N482-24 zeigte in der Analyse, dass funktionsfähige Proteine entstehen können und wurde daher als Kandidatenlinie ausgeschlossen. In der Linie N482-47 wird für die Transkriptvariante 1 ein vorzeitiges Stopcodon für das Alba-Allel bei 15 % des Gesamtproteins erzeugt, für das Tremula-Allel bei 10,3 % des Gesamtproteins, sodass von einem Funktionsverlust ausgegangen werden kann (Isshiki *et al.*, 2001). Für das Alba-Allel kann ein mögliches Protein mit 88 % der Proteinlänge ohne das N-terminale Signalpeptid auf einem anderen Leseraster erzeugt werden. Bezug nehmend auf Isshiki *et al.* (2001) kann dieses Protein demnach erzeugt werden. Signalpeptide sind für die Insertion von Membran- und sekretorische Proteine essentiell (Martoglio und Dobberstein, 1998). Die LysM-Rezeptor-ähnlichen-Kinasen gehören funktionell zu den Transmembranproteinen (Burendia *et al.*, 2018), ebenso gehören die Nod-Faktor-Rezeptoren der Leguminosen zu den Membranproteinen (Gust *et al.*, 2012.). Anhand der phylogenetischen Analysen wird vermutet, dass die *NFP-like*-Kandidatengene ebenfalls für Membranproteine kodieren. Dementsprechend müsste bei einem Verlust des Signalpeptides die Insertion in die Plasmamembran nicht mehr gewährleistet sein und das Protein somit als Membranprotein funktionslos sein. Jedoch zeigte sich für *NFP-like3*, dass die Transkriptvariante 2 ein Protein ohne Signalpeptid erzeugt, sodass vermutet werden kann, dass das Protein eine andere

Funktion in der Zelle einnehmen kann. Das durch alternatives Spleißen erzeugte Protein der Transkriptvariante 2 kann in der Zelle mutmaßlich regulatorische Aufgaben übernehmen (Syed *et al.*, 2012). Diese Vermutung wird weiterhin gestützt, da beide Transkriptvarianten von *NFP-like3* des Tremula-Allels Proteine ohne LysM-Domäne erzeugen. LysM-Domänen sind Proteindomänen extrazellulärer Proteine, die Peptidoglycan und Chitin binden (<http://pfam.xfam.org/family/pf01476>, 07.07.2020). Dem durch das Tremula-Allel kodierte Protein kann daher keine Funktion in der Erkennung pilzlicher Organismen zugeschrieben werden.

Die Modifikation von *NFP-like4* erzeugte nach *in silico*-Analyse für die Linie N482-47 ein vorzeitiges Stopcodon, sodass ein Protein mit einer Länge von 10,3 % des Gesamtproteins erzeugt wird und von einem Funktionsverlust ausgegangen werden kann. Ein Protein ohne Signalpeptid ist jedoch auf einem anderen Leseraster möglich. Da die Signalpeptide für die Insertion von Membran- und sekretorischen Proteinen essentiell sind (Martoglio und Dobberstein, 1998), kann das Protein mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht als Membranprotein fungieren. Wenn den Proteinen eine Funktion bei der Erkennung pilzlichen Chitins oder Peptidoglycans zukommt, können die Proteine ihre Funktion nicht mehr erfüllen, sodass von einem Funktionsverlust ausgegangen werden kann.

Die *in silico*-Proteinstrukturanalyse von *NFP-like3* insbesondere des Tremula-Allels lässt die Frage nach der Funktion der Proteine ohne Signalpeptid und ohne LysM-Domäne offen. Zur Klärung der Lokalisation der Proteine könnten diese mit einem Fluoreszenz-Marker markiert und in der Zelle exprimiert werden, sodass die Lokalisation über mikroskopische Analysen nachgewiesen werden kann.

Schlussfolgerungen

Zusammenfassend kann aus der *in silico*-Analyse, der aus RNA abgeleiteten cDNA gefolgert werden, dass für *NFP-like1* durch die Generierung von vorzeitigen Stopcodonen nur stark verkürzte Proteine gebildet werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit funktionslos sind. Es zeigte sich für *NFP-like3* und *NFP-like4*, dass Modifikationen in der genetischen Information zwar auf dem eigentlichen Leseraster zu einem Stopcodon führen, aber auf alternativen Leserastern funktionsfähige Proteine entstehen könnten. Ebenso, dass für die Transkriptvariante 2 von *NFP-like3* ein Protein ohne Signalpeptid kodiert wird. Daher kann vermutet werden, dass den Proteinen ohne Signalpeptid in der Zelle eine andere Funktion zukommt. Trotz der Modifikation in den Kandidatengenen konnten dennoch funktionsfähige Proteine erzeugt werden. Anhand dieser Analyse wurden die Kandidatenlinien ausgewählt, in

denen durch vorzeitige Stopcodonen die Proteine verkürzt waren oder kein Signalpeptid aufwiesen. Es konnten Linien für Mykorrhizierungsversuche mit einer Einzelmodifikation in *NFP-like1*, einer Doppelmodifikation in *NFP-like3* und *NFP-like4* sowie einer Dreifachmodifikation in allen *NFP-likes* erzeugt werden in denen mit hoher Wahrscheinlichkeit kein Membranprotein erzeugt wird. Falls die Kandidatengene in die Ausbildung einer Symbiose mit pilzlichen Organismen involviert sind und sie für Membranproteine kodieren, müsste ihre Funktion aufgehoben sein.

4.4.5 Modifikationsveränderung über die Zeit

Zur Analyse einer stabilen Modifikation in den Kandidatenlinien wurden 7 Monate nach der ersten Sequenzierungsanalyse erneut Sanger-Sequenzierungen der Kandidatenlinien durchgeführt. Während der 7 Monate wurden die Pflanzen ca. sechsmalig über Kopfstecklinge vermehrt. Ding *et al.* (2020) erzeugten aus einer folgenden Regeneration von Blättern chimärer transgener Pappellinien homozygote Linien. Es zeigte sich, dass sich in *NFP-like1* der Einzel- und Doppeltransformation keine zusätzlichen Modifikationen über die Zeit etablierten. Vermutlich konnten keine homozygoten Modifikationen beobachtet werden, da im Gegensatz zu Ding *et al.* (2020) die Pflanzen ausschließlich über Kopfstecklinge vermehrt wurden und nicht über eine erneute Regeneration aus Blattmaterial erfolgte. Weiterhin wurde im Gegensatz zu Ding *et al.* (2020) nicht das *Phytoene desaturase*-Gen modifiziert, welches bei einem *Knockout* in der Pappel zu einem Albino-Phänotyp führt, sodass chimäre Strukturen leicht zu erkennen sind. Eine weitere Regeneration über Blattmaterial hätte, sofern das Blattmaterial von den nicht-transgenen Material getrennt werden könnte, zu homozygoten Linien führen können.

Die Modifikation eines Einzelnukleotides an Position 4 nach der PAM-Sequenz kann bereits dazu führen, dass die Cas9-Nuklease das Target nicht mehr erkennt und keinen Doppelstrangbruch erzeugen kann. Diese Einschätzung wird durch Fu *et al.* (2013) belegt, die zeigten, dass eine Modifikation in den ersten zehn Nukleotiden die Effektivität der gRNA drastisch verringert. Feng *et al.* (2014) untersuchten die Modifikationsraten von transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen, die in der T1-Generation ausschließlich dem Kontroll-Klon entsprechend oder Chimären waren. In der Folgegeneration T2 konnten alle möglichen Genotypen beobachtet werden (Feng *et al.*, 2014). In den homozygoten Linien sowie den biallelisch modifizierten Linien waren die Modifikationen stabil in die T3-Generation übergegangen, in Abwesenheit und Anwesenheit der Cas9-Nuklease (Feng *et al.*, 2014). In *Arabidopsis* werden die Folgegenerationen über Samen in der Nachkommenschaft erzeugt, sodass es zu Rekombination im Erbgut kommt. Die Vermehrung der Pappel erfolgte in dieser

4 Diskussion

Arbeit lediglich über Kopfstecklinge, bei denen es nicht zu einem Austausch von genetischem Material kommt. Dennoch zeigten Feng *et al.* (2014), dass trotz Vorhandensein der Cas9-Nuklease keine weiteren Modifikationen an bereits editierten Positionen nachgewiesen werden konnten, gleiches wurde für die Linien der *NFP-like1* Modifikationen bestätigt. Lediglich die Linie N481-2 musste bei der zweiten Sanger-Sequenzierung als Chimäre eingestuft werden. Möglicherweise wurde in der zweiten Sanger-Sequenzierung transformiertes und nicht-transformiertes Gewebe in die Sequenzierungsanalyse eingesetzt. Für vier Linien zur Modifikation von *NFP-like3* und *NFP-like4* konnten keine weiteren Modifikationen beobachtet werden, auch nicht in Linien, die in der Sequenzanalyse genetisch dem Kontroll-Klon P1 entsprachen. Feng *et al.* (2014) fanden, dass das CRISPR/Cas9-System auch in der zweiten und dritten Nachkommenschaft noch aktiv war. Die von Feng *et al.* (2014) untersuchten Linien wurden mit einem CRISPR/Cas-System transformiert, in dem die Cas9-Nuklease unter dem konstitutiven 35-S Promotor des Blumenkohlmosaikvirus exprimiert wurde. Anhand dieser Studie würde erwartet werden, dass die Cas9-Nuklease an den nicht modifizierten Zielsequenzen erneut Doppelstrangbrüche erzeugt. Jedoch zeigten sich die gRNA3 und gRNA4 als nicht effizient (Unterabschnitt 4.4.1), sodass eine weitere Modifikation höchst unwahrscheinlich ist. Weiterhin muss der durch CRISPR/Cas9 erzeugte Doppelstrangbruch bei der zelleigenen Reparatur nicht zwangsläufig in einer fälschlichen Reparatur resultieren.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass der konstitutive Promotor über zelleigene Mechanismen stillgelegt wurde (Park *et al.*, 1996; Elmayan und Vaucheret, 1996; Mishiba *et al.*, 2005). Matzke *et al.* (1989) berichteten, dass T-DNAs bei einer sequentiellen Transformation in Abhängigkeit des Integrationsortes der zweiten transformierten T-DNA über Methylierung inaktiviert werden können. Das Vorhandensein von mehreren T-DNAs im pflanzlichen Genom könnte somit zu einer Inaktivierung der transgenen Sequenzen geführt haben.

Zur Verbesserung der T-DNA-Konstrukte könnte ein aus Pflanzen stammender Promotor verwendet werden, da diese von der Pflanze nicht als fremdartig erkannt und demnach nicht stillgelegt werden (Potenza *et al.*, 2004). In den Linien zur Modifikation aller Kandidatengene wurden zwischen den gewählten Zeitpunkten unterschiedliche Modifikationen nachgewiesen. In *NFP-like4* der Linie N483-8 wurde aus einer heterozygot monoallelischen Modifikation eine homozygote Modifikation. Wenn die Cas9-Nuklease weiterhin aktiv ist, wäre dies eine Erklärungsmöglichkeit für eine weitere Modifikation. Die Linie N483-6 zeigte in der ersten Sequenzierung eine heterozygot monoallelische Modifikation, zum zweiten Zeitpunkt konnte

jedoch keine Modifikation nachgewiesen werden. Mutmaßlich handelt es sich bei der Linie N483-6 um eine Chimäre, bei der in der ersten Analyse transformiertes, genetisch verändertes Gewebe und in der zweiten Analyse ausschließlich nicht-verändertes Gewebe in die DNA-Isolation eingeschlossen wurde. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass eines der Allele in der Sequenzierung unterrepräsentiert war. Zum Ausschluss dieser Vermutung sollten die Amplikons in einen Vektor kloniert und erneut sequenziert werden.

Schlussfolgerungen

Die Modifikationsanalyse zu zwei verschiedenen Zeitpunkten ergab, dass für die Einzeltransformationen stabile Modifikationen nachgewiesen werden konnten, unabhängig ob eines oder beide Allele modifiziert worden sind. In den Doppeltransformationen wurden hingegen weitere Modifikationen nachgewiesen. Waren beide Allele modifiziert, konnten keine zusätzlichen Modifikationen in den Doppeltransformationen nachgewiesen werden, sodass transgene Pappellinien mit einer homozygoten oder heterozygot biallelischen Modifikation stabil sind, wenn diese über Kopfstecklinge vermehrt werden.

4.4.6 OFF-Target-Analyse

Bei der Verwendung von CRISPR/Cas9 zur gezielten Modifikation von Zielsequenzen spielen mögliche Modifikationen an anderen genomischen Positionen, die eine in der zum Target ähnliche Sequenz aufweisen und daher ebenfalls von der gRNA angesteuert und modifiziert werden können, eine Rolle. Wie die Analyse zur weiteren Modifikation an den Targets in Abschnitt 4.4.5 gezeigt hat, konnten für die Einzeltransformationen keine derartig weiteren Modifikationen nachgewiesen werden. Mutmaßlich ist bereits die Modifikation eines einzelnen Nukleotids ausreichend, sodass die Cas9-Nuklease nicht mehr binden kann. Zur Analyse möglicher OFF-Targets zu den gewählten gRNAs wurden je gRNA fünf transgene Linien auf eine Modifikation in dem gewählten OFF-Target untersucht. Das OFF-Target zur gRNA1 befand sich intergenisch auf Chromosom17, das OFF-Target zur gRNA2 in Potri.014G112500. Das OFF-Target zu gRNA3 und gRNA4 befand sich auf Chromosom 12; während das für gRNA3 intergenisch lokalisiert war, lag das für gRNA4 in Potri.010G078700 (*NFP-like4*). Für keine der Linien konnte eine Modifikation nachgewiesen werden. Wolt *et al.* (2016) berichteten, dass anhand der vorhandenen Daten zu OFF-Targets in Pflanzen vermutet werden kann, dass OFF-Target-Modifikationen selten auftreten. Studien in Reis ergaben, dass Modifikationen an möglichen OFF-Targets ca. fünfmalig geringer waren als an ON-Targets (Xie und Yang, 2013). Weiterhin wurde gezeigt, dass *Mismatches* an den Nukleotiden 1–10

(3'-Ende nach 5'-Ende) der gRNA einen drastischen Effekt auf die Effizienz der gRNA aufwies (Fu *et al.*, 2013) und dass Mutationen in der PAM-Sequenz und der *Seed*-Region zu einer Nicht-Erkennung des Targets führen (Jiang *et al.*, 2013).

Die anhand von *P. trichocarpa* gewählten OFF-Targets mit der höchsten Wahrscheinlichkeit einer Modifikation zeigten an unterschiedlichen Positionen der gRNA abweichende Nukleotide. In der gRNA1 war ein Nukleotid in der PAM-Sequenz verändert, sodass diese nicht mehr das typische NGG-Motiv aufwies. Dementsprechend konnte die Cas9-Nuklease das Target nicht mehr als solches erkennen, obwohl die gRNA-Sequenz identisch war. Das OFF-Target der gRNA2 hatte eine Modifikation an Position 12 und könnte tolerierbar sein, jedoch war die Sekundärstruktur der gRNA2 nicht optimal, folglich konnte am eigentlichen Target keine Modifikation erzeugt werden und ebenfalls am OFF-Target zu keiner Modifikation führen. Für die gRNA3 und gRNA4 konnten ebenfalls abweichende Nukleotide zur gRNA am OFF-Target nachgewiesen werden. In der gRNA3 an Position 15 und in der gRNA4 an insgesamt 5 Positionen. Besonders hervorzuheben ist die Modifikation an Position 1, die zu einer verminderten Effektivität der gRNA führt (Fu *et al.*, 2013). Nicht außer Acht zu lassen ist, dass die OFF-Targets anhand der Sequenz von *P. trichocarpa* bestimmt wurden, mutmaßlich sind in dem verwendeten Kontroll-Klon P1 andere OFF-Targets zu den gewählten gRNAs möglich, die nicht betrachtet wurden. Zum Ausschluss einer OFF-Target-Modifikation wären genomweite Sequenzierungen der transgenen Linien nötig.

Schlussfolgerungen

Die möglichen OFF-Targets der gewählten Zielgene zeigten keine Modifikationen, das kann einerseits auf die Effektivität der gewählten gRNAs, andererseits auf die Position der abweichenden Nukleotide im Genom zurückzuführen sein. Es wurde pro gRNA nur ein mögliches OFF-Target betrachtet, das anhand der *P. trichocarpa*-Sequenz ausgewählt wurde. Optimaler wäre eine Gesamtgenomsequenzierung der editierten Linien, um auszuschließen, dass eine OFF-Target-Modifikation stattgefunden hat. Die Ergebnisse zeigen, dass wenn eine abweichende Sequenz der OFF-Targets zu der gRNA-Sequenz an bestimmten Nukleotidpositionen vorliegt, die gRNA nicht mehr binden kann.

4.5 Mykorrhizierungsverhalten von *NFP-like* modifizierten Pappeln

Zur Analyse eines möglicherweise veränderten Mykorrhizierungsverhaltens, hervorgerufen durch die CRISPR/Cas9-induzierten Modifikationen in den Kandidatengenen, wurden Mykorrhizierungsversuche durchgeführt. Die Versuche wurden an zwei Kandidatenlinien, N481-97 mit einer Modifikation in *NFP-like1* und N483-8 mit Modifikationen in den Kandidatengenen *NFP-like1*, *NFP-like3* und *NFP-like4* sowie dem nicht-transgenen Kontroll-Klon P1 durchgeführt. Einem Teil der Kandidatenlinien und dem Kontroll-Klon P1 wurde ein Mykorrhiza-Substrat zugegeben, während der gleiche Anteil der Linien ohne Mykorrhiza-Substrat wuchs. Sofern die Kandidatengene eine Funktion bei der Ausbildung einer Symbiose mit mykorrhizierenden Pilzen innehaben, wurde eine verringerte Mykorrhizierung in den transgenen Linien erwartet (Abbildung 4.1).

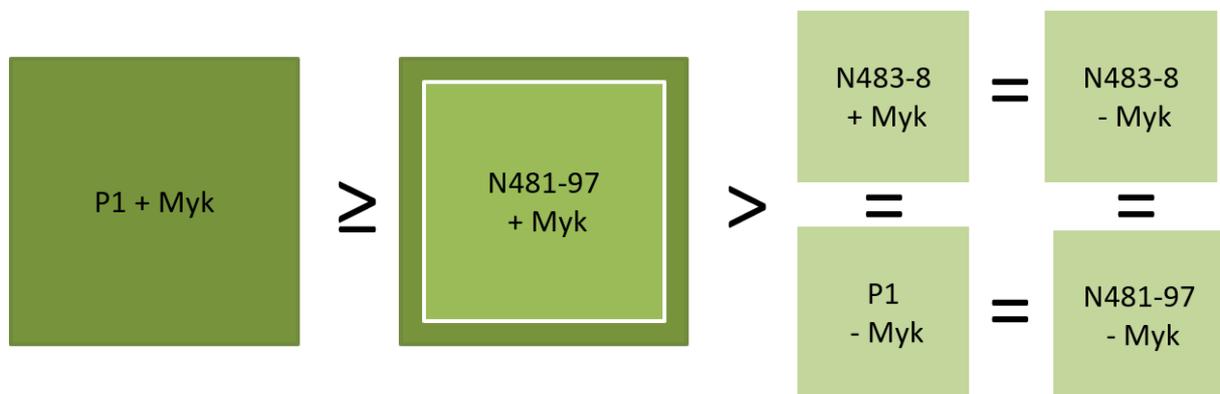


Abbildung 4.1: Hypothetisches Wachstumsmodell bei Mykorrhizagabe

Schematische Darstellung der angenommenen Wachstumsverhältnisse im Mykorrhizierungsversuch beim Vergleich des Kontroll-Klons P1 mit den *NFP-like1* (N481-97) und *NFP-like1*, *NFP-like3* und *NFP-like4* (N483-8) modifizierten transgenen Linien. N481-97: Modifiziert in *NFP-like1*; N483-8: Modifiziert in *NFP-like1*, *NFP-like3* und *NFP-like4*; + Myk: Zugabe von Mykorrhizen; - Myk: keine Zugabe von Mykorrhizen.

Bei der phänotypischen Analyse der Pflanzen mit und ohne Mykorrhizagabe ergaben sich für die Parameter Höhe, Anzahl der Blätter und Durchmesser keine signifikanten Unterschiede zwischen den beimpften und nicht-beimpften Linien. Ebenso bestand kein signifikanter Unterschied zum Kontroll-Klon P1. Ein signifikanter Unterschied zwischen der beimpften Linien und der nicht-beimpften Linien konnte für N481-97 und N483-8 bezüglich des Frisch- und Trockengewichtes beobachtet werden, dass in nicht-beimpften Pflanzen signifikant höher war. Kein Unterschied im Frisch- und Trockengewicht konnte für den Kontroll-Klon P1 beobachtet werden, weiterhin bestand kein Unterschied zu P1 und den transgenen Linien. Bei einer Symbiose mit mykorrhizierenden Pilzen ist die Nährstoffaufnahme der Pflanze verbessert, sodass sich dieses positiv auf das Wachstum (Abuzinadah und Read, 1986; Smith

und Read, 2008), die pflanzliche Gesundheit und die Abwehr gegenüber biotischen und abiotischen Stressfaktoren auswirkt (Jeffries *et al.*, 2003). Gracia *et al.* (2017) zeigten, dass mykorrhizierte *Medicago truncatula* durch einen Kaliumentzug weniger beeinflusst waren als nicht-mykorrhizierte *Medicago truncatula*. Weiterhin zeigten Bojarczuk *et al.* (2015), dass eine Mykorrhizagabe bei *P. × canescens* die Toleranz gegenüber Schwermetallen erhöht. Durch eine Mykorrhizierung mit *Paxillus involutus* wurde die Toleranz von *P. × canescens* gegenüber Salzstress erhöht (Langenfeld-Heyser *et al.*, 2007).

Warum die Linien in dem Versuch mit und ohne Mykorrhizagabe keine sichtbaren Unterschiede im Wachstum aufwiesen, kann nur spekuliert werden. Eine Mykorrhizierung ist oftmals nach einer Wachstumsphase oberirdisch noch nicht nachweisbar (Kutscheidt, 2017). Um eine Mykorrhizierung an den Wurzeln nachzuweisen, erfolgten binokularische und genetische Untersuchungen der Wurzelballen und Wurzeln mit assoziierten Mykorrhizen.

In dem verwendeten Mykorrhiza-Substrat waren nach Herstellerangaben die endomykorrhizierenden Pilze *Rhizoglyphus irregularis*, *Funneliformis mosseae* und *Funneliformis caledonium* enthalten. Zusätzlich waren folgende vier Ektomykorrhiza-Pilze in dem Mykorrhiza-Substrat: *Amanita muscaria*, *Hebeloma crustuliniforme*, *Cenococcum geophilum* und *Pisolithus arhizus*. *Amanita muscaria* geht eine Symbiose mit der gemeinen Fichte (*Picea abies*) ein. *Hebeloma crustuliniforme* bildet beispielsweise Mykorrhizen an Hänge-Birke (*Betula pendula*), Schwarz-Fichte (*Picea mariana*), Sitka-Fichte (*Picea sitchensis*) und der Küsten-Kiefer (*Pinus contorta*) aus (Abuzinadah und Read, 1986). *Cenococcum geophilum* wurde als mykorrhizierender Pilz an *Populus tremula* nachgewiesen (Bahram *et al.*, 2011), kann aber auch mit zahlreichen anderen Wirtspflanzen eine Symbiose eingehen (Douhan *et al.*, 2005). *Pisolithus tinctorius* geht mit zahlreichen Wirten eine symbiontische Beziehung ein, unter anderem mit Birken (*Betula*), Kiefern (*Pinus*) und der amerikanischen Zitterpappel (*Populus tremuloides*) (Marx, 1977). *Pisolithus tinctorius* ist ein Synonym für *Pisolithus arhizus* (Cairney *et al.*, 1997). Die verwendeten mykorrhizierenden Pilze an ihren Wirtspflanzen sehen stark unterschiedlich aus, eine Wurzelsymbiose des Amanita-Typs ist in Nilsson *et al.* (2005) zu finden, mit *Hebeloma crustuliniforme* assoziierte Wurzelspitzen von *P. × canescens* sind von Bojarczuk *et al.* (2015) nachgewiesen worden und eine Symbiose von *Cenococcum geophilum* an *Picea abies* Wurzeln wurden von Nedelin (2014) beschrieben. Die genannten Pilze sind anhand ihrer Strukturen an den Wurzelspitzen deutlich zu unterscheiden. Zur Analyse einer Mykorrhizierung an den Wurzeln der untersuchten Linien, dem Kontroll-Klon P1, N481-97

und N483-8 wurde angestrebt, insbesondere die von Nilsson *et al.* (2005), Bojarczuk *et al.* (2015) und Nedelin (2014) dargestellten Strukturen, zu finden.

Bei der Untersuchung der Wurzeln beimpfter und nicht-beimpfter Pflanzen waren in allen Linien mykorrhizaartige Strukturen nachweisbar. Im Vergleich zu den Mykorrhizen, die in der Substratmischung enthalten sein sollen, könnten die beobachteten Strukturen in zwei Linien eventuell für eine Mykorrhizierung mit *Hebeloma crustuliniforme* sprechen, jedoch konnten die hyphenartigen Strukturen um den Mantel herum nicht beobachtet werden. Strukturen, die einer durch *Amanita*- oder *Cenococcum*-vermittelten Mykorrhizierung ähnlich sind, wurden nicht beobachtet. Fraglich ist, warum die im Mykorrhiza-Substrat enthaltenden Pilze keine Symbiose mit den Wirtspflanzen eingegangen zu sein schienen. Mutmaßlich war das bezogene Inokulum nicht funktionsfähig, denn zumindest *Cenococcum geophilum* kann mit Hybridaspn eine Symbiose eingehen (Kaldorf *et al.*, 2004). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass eine Mischung aus mehreren endomykorrhizierenden und ektomykorrhizierenden Pilzen verwendet wurde (Kutscheidt, 2017). Nachteilig an einer solchen Mischung ist, dass sich Pilze mit einer geringen oder ohne Symbioseleistung an die Wurzeln anlagern und diese für effizientere Symbiosepartner blockieren (Kutscheidt, 2017). Weiterhin bemerkte Kutscheidt (2017), dass die im verwendeten Substrat vorhandenen Pilze *Paxillus involutus* und *Pisolithus tinctorius* sich nicht zwingend positiv auf den Wirt auswirken können. Ersterer bildet bisweilen keine Symbiose aus und ernährt sich von totem organischem Material und letzterer wächst zunächst schnell, kann sich aber nicht lange an den Wurzeln halten (Kutscheidt, 2017). Der Nachweis der Pilze, die sich an den Wurzelspitzen in allen Linien, nach Substratgabe oder ohne Substrat angesiedelt hatten, erfolgte über DNA-Isolation und ITS-Amplifikation.

Die Sequenzanalyse der mykorrhizierten Wurzelspitzen nach ITS-Amplifikation ergab, dass es sich um einen nicht kultivierten Pilz ohne Artbezeichnung, *Tomentella spec.*, uncultured *Tomentella*, uncultured *Telephoraceae* oder um *Tomentella ellisii* handelte. Die Pilze waren erstaunlicher Weise in allen Pflanzen vorhanden, obwohl die Erde vor dem Ansetzen des Versuches durch Autoklavieren sterilisiert wurde. Möglicherweise wurde die Erde während des Wachstums der Pflanzen in der Klimakammer oder im Gewächshaus mit den genannten Pilzen kontaminiert. Kipfer *et al.* (2010) untersuchten die Auswirkung eines Erhitzens der Erde auf die vorhandenen mykorrhizierenden Pilze, die in der Erde enthalten waren. Insbesondere *Cenococcum* konnte in den auf 70 °C erhitzten Proben nachgewiesen werden, wohingegen *Tomentella spec.* bereits bei einem Erhitzen auf 45 °C nicht mehr vorhanden war (Kipfer *et al.*, 2010). Dies würde gegen eine Kontamination in der autoklavierten Erde

sprechen, zumal diese auf 121 °C erhitzt und 2,5 h inkubiert wurde. Dunn *et al.* (1985) zeigten, dass Pilze einen Bereich von 60–80 °C nicht überleben. Die beobachteten und nachgewiesenen Pilze wurden demnach von außen eingetragen.

Rudawska *et al.* (2018) beobachteten an *Carya cordiformis* (Bitternuss) und *Carya laciniosa* (Königsnuss) verschiedene Ekto- und arbuskuläre Mykorrhizen und konnten unter anderem acht verschiedene *Tomentella*-Arten nachweisen. Die von Rudawska *et al.* (2018) nachgewiesenen *Tomentella*-Arten unterschieden sich in ihrer Farbe und Struktur deutlich, dies erklärt, dass trotz zwei bis drei verschiedener beobachteter Strukturen die gleiche Art über ITS-Sequenzierung nachgewiesen wurde. Die am häufigsten an den Wurzeln beobachteten Strukturen ähneln einer *Tomentella*-Art die von Rudawska *et al.* (2018) nicht weiter klassifiziert wurde. Jedoch konnte auch eine weitere von Rudawska *et al.* (2018) nicht weiter klassifizierte *Tomentella*-Art, in den untersuchten Wurzelspitzen nachgewiesen werden. Beim *Alignment* der in Rudawska *et al.* (2018) angegebenen *NCBI Accession Nummern* zu den gewonnenen ITS-Sequenzen, mit den ITS-Sequenzen dieser Arbeit, sind jedoch Sequenzunterschiede vorhanden, sodass es sich bei dem vorhandenen Pilz um eine andere *Tomentella spec.* handelte.

Die von Karldorf *et al.* (2004) beobachteten und als *Tomentella spec.* identifizierten, mykorrhizierende Strukturen an Hybridaspfen sind denen an P1 und den transgenen Regeneraten beobachteten Strukturen ähnlich. Die in Karldorf *et al.* (2004) genannten Feldversuche wurden an verschiedenen Hybridaspfen im Arboretum des Thünen Instituts für Forstgenetik in Großhansdorf, Deutschland, durchgeführt. Die in dieser Arbeit durchgeführten Mykorrhizierungsversuche erfolgten am gleichen Standort, jedoch im Gewächshaus. Die Pilze könnten dementsprechend von außen in das Gewächshaus eingetragen worden sein, sodass das Vorhandensein von *Tomentella spec.* in dem angesetzten Versuch erklärbar ist.

Mutmaßlich hat die Mykorrhizierung mit *Tomentella* die Mykorrhizierung mit den angeimpften Pilzen gestört. Zudem könnte die Mykorrhizierung der Pilze im Substrat so gering sein, dass sie in der binokularischen Analyse nicht beobachtet wurden. Versuche an 19 verschiedenen Baumarten in Bayern zur Analyse einer Wirkung auf das Wachstum und Vitalität bei Gabe von Mykorrhizen erfolgte mit dem in dieser Arbeit verwendeten Mykorrhiza-Substrat von INOQ Forst und resultierte in keiner sichtbaren Veränderung (Kutscheidt, 2017). Weiterhin konnten wie in dem beschriebenen Versuch keine der im Substrat enthaltenden Mykorrhizen nachgewiesen werden (Kutscheidt, 2017). Anhand dieser Studie kann erklärt werden, warum an den untersuchten Linien keine Mykorrhizen nachgewiesen werden konnten.

4 Diskussion

Der erwartete Effekt eines besseren Wachstums und einer stärkeren Bewurzelung der angeimpften Linien, konnte nicht beobachtet werden, da auf Grund der vorhandenen mykorrhizierenden *Tomentella*-Arten in allen Linien eine gleiche Grundlage vorlag. Jedoch wäre ein Unterschied, zwischen dem nicht-transgenen Kontroll-Klon P1 und den transgenen Linien erwartet worden, sofern die modifizierten Gene in die Ausbildung der Mykorrhizierung involviert sind. Anhand der Expressionsanalysen wurde wie bereits erwähnt vermutet, dass *NFP-like1* funktionslos ist, sodass ein Unterschied zwischen P1 und der in *NFP-like1* modifizierten Linie N481-97 gering oder nicht vorhanden sein könnte. Für die Linie N483-8, die in den Kandidatengenen *NFP-like1*, *NFP-like3* und *NFP-like4* modifiziert war, wäre ein Unterschied zu P1 und N481-97 erwartet worden. N483-8 ist in der Tendenz etwas höher gewachsen als P1 und N481-97, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Zu bemerken ist außerdem, dass die Linien sich in ihrem Wachstum kaum unterschieden, ein Effekt durch die durchgeführte Transformation kann daher ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend konnte aus dem Mykorrhizierungsversuch kein Hinweis auf ein verändertes Mykorrhizierungspotential der transgenen Linien im Vergleich zum Kontroll-Klon P1 beobachtet werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass die gewählten Kandidatengene nicht in die Ausbildung der Ektomykorrhizierung involviert sind oder das falsche Mykorrhiza-Substrat verwendet wurde. *Lotus japonicus nfr5*-Mutanten zeigten einen Effekt bei der Ausbildung der Rhizobien-Symbiose, jedoch keinen Effekt bei der Ausbildung der endomykorrhizierenden Symbiose (Stougaard, 2001). Da *LtNFR5* mit *NFP-like1* und *NFP-like2* in den phylogenetischen Studien näher verwandt ist als zu *NFP-like3* und *NFP-like4* kann dies eine Erklärung sein, dass in N481-97 kein Unterschied zum nicht-transgenen Kontroll-Klon P1 beobachtet werden konnte. Zhang *et al.* (2015) zeigten, dass *NFR1* aus *Lotus japonicus* und *LYK3* aus *Medicago truncatula* wichtig für die Erkennung der pilzlichen Lipo-chitooligosaccharide sind und dass nicht, wie angenommen *NFR5* aus *Lotus japonicus* und *NFP* aus *Medicago truncatula* diese Aufgabe zukommt. Beim Vergleich mit der phylogenetischen Studie zu Beginn der Arbeit (Abbildung 3.1) ist ersichtlich, dass sich *NFR1* und *LYK3* in einem anderen Bereich gruppieren (Chitinbindung und aktive Kinase), als die verwendeten Gene zu Analyse der Symbiose. Weiterhin zeigten Zhang *et al.* (2015), dass *OsCERK1* in Reis der nächste Verwandte zu *NFR1* ist und beim *Knockdown* von *OsCerk1* die Ausbildung der Mykorrhizierung reduziert ist. Da in den transgenen Linien die orthologen Gene zu *LjLYS11* und *LjNFR5* aus *Lotus* sowie *MtLYR1* und *MtNFP* aus *Medicago* verwendet wurden, kann die Symbiose mutmaßlich über andere Gene aus der Gruppierung „Chitinbindung und aktive Kinase“ vermittelt werden. Mutmaßlich haben die Kandidatengene

NFP-like3 und *NFP-like4* ebenfalls eine andere Funktion. Eine weitere mögliche Erklärung, dass keine Unterschiede ersichtlich waren, kann eine zu geringe Mykorrhizierung sein. Vermutlich war der geringe Anteil an vorhandener Mykorrhizierung nicht ausreichend, um die Pflanze mit zusätzlichen Nährstoffen zu versorgen, sodass keine Wachstumsunterschiede ausgebildet wurden.

Schlussfolgerungen

Unter den durchgeführten Bedingungen konnten keine Unterschiede zwischen den genetisch veränderten Linien und dem Kontroll-Klon P1 beobachtet werden. Eine Wiederholung des Versuches sollte daher angestrebt werden, um eine mögliche Beteiligung der Kandidatengene *NFP-like1*, *NFP-like3* und *NFP-like4* bei der Ausbildung einer Symbiose aufzuklären. Hierzu sollte das Experiment insofern angepasst werden, dass der Eintrag von Mikroorganismen von außerhalb unterbunden wird. Weiterhin sollten endomykorrhizierende und ektomykorrhizierende Pilze einzeln verwendet werden (Kutscheidt, 2017), möglicherweise wäre die Wahl von Pilzen, die nachweislich eine Mykorrhizierung an Pappeln erzeugen, besser. Ebenso könnte ein Rhizobien-ausbildendes Bakterium wie beispielsweise *Mesorhizobium loti* verwendet werden, das in *Lotus* bei Funktionsverlust nicht zur Ausbildung einer Rhizobien Symbiose führt (Radutoiu *et al.*, 2003). Der Versuch sollte einen Zeitraum von zwei bis drei Wachstumsperioden umfassen, da nach einer Wachstumsphase oberirdisch meistens noch keine Auswirkungen auf das Wachstum nachweisbar sind (Kutscheidt, 2017).

4.6 Infektionsversuche mit *Melampsora spec.*

Die *NFP-like* modifizierten Pappeln sollten auch hinsichtlich einer möglichen veränderten Anfälligkeit oder Resistenz gegenüber *Melampsora spec.* untersucht werden. Hierfür war es zunächst notwendig, das Toleranzspektrum der verwendeten Rostpilze an verschiedenen Pappelklonen und -hybriden zu testen. Dazu wurde ein *in vitro*-Infektionstest etabliert.

4.6.1 Vergleich der Befallssymptome verwendeter *Melampsora spec.*

Durch *Melampsora spec.* wird eine der schlimmsten Krankheiten an Pappeln ausgelöst (Steenackers *et al.*, 1996). Eine Infektion mit *Melampsora spec.* führt zu vorzeitigem Blattverlust, einem verspäteten Austreiben und daher zu einem Biomasseverlust in der nächsten Wachstumsperiode (Steenackers *et al.*, 1996). Besonders in Belgien tritt der *Melampsora*-Stamm *Melampsora larici-populina* an Pappeln auf und bedingt schwere Rostinfektionen, die zumeist mit einer Anfälligkeit gegenüber anderen Pathogenen

einhergehen und die Pappelproduktion deutlich reduziert (Steenackers *et al.*, 1996). In Europa werden überwiegend Pappeln der Sektionen *Aigeiros*, *Tacamahaca* und *Populus* in Kurzumtriebsplantagen angebaut (Steenackers *et al.*, 1996). Die verwendeten Klone sind unterschiedlich anfällig gegenüber Pathogenen, jedoch haben viele der Klone in den letzten 20 Jahren ihre vollständige Resistenz gegenüber *Melampsora larici-populina* verloren (Pinon und Frey, 2005).

Zur Analyse einer Anfälligkeit oder Resistenz der Pappelklone gegenüber zwei verschiedenen Pappelrostarten wurden 20 Pappelklone unterschiedlicher Sektionen mit zwei verschiedenen *Melampsora spec.* inokuliert. Es zeigte sich, dass für den verwendeten *Melampsora larici-populina*-Stamm 17 von 20 Pappelklonen mit Sporenlagern und/oder Nekrose reagierten. Bei der Inokulation mit *Melampsora larici-tremulae* reagierten lediglich 11 von 20 Pappelklonen nekrotisch und/oder mit der Ausbildung von Sporenlagern. Weiterhin unterschied sich die maximal eingenommene Blattfläche je nach Infektionsmerkmal für beide Stämme. Maximal 60 % der Blattfläche wurden mit *Melampsora larici-populina*-Sporenlagern überdeckt, während die *Melampsora larici-tremulae*-Sporenlager im Maximum 25 % der Fläche einnahmen. Dies bestätigt, dass der verwendete *Melampsora larici-populina* infektiöser ist als der *Melampsora larici-tremulae*. Dowkiw *et al.* (2003) beschrieben, dass durch eine Infektion mit *Melampsora larici-populina* Wachstumseinbußen von bis zu 50 % an sechsjährigen Pappeln hervorgerufen wurden. Neben der im Allgemeinen zu beobachtenden *Melampsora*-Sporenlagern konnten insbesondere für *Melampsora larici-populina* eine Reaktion auf das Inokulat mit nekrotischer Blattfläche beobachtet werden. Die durch Nekrose eingenommene maximale Blattfläche unterschied sich bei beiden Stämmen lediglich um 10 %, jedoch war dieses Merkmal bei dem *Melampsora larici-populina*-Stamm bei 13 Klonen zu finden, beim *Melampsora larici-tremulae*-Stamm bei drei Klonen. Weiterhin reagierten sechs Klone der Sektion *Populus* gegenüber *Melampsora larici-populina* mit der Ausbildung einer Nekrose, obwohl die Klone dieser Sektion gegenüber *Melampsora larici-populina* resistent sein sollten (persönliche Mitteilung von Pascal Frey, INRA, Nancy, Frankreich). Mutmaßlich hat sich der *Melampsora*-Stamm an seinen neuen Wirt, einige Pappeln der Sektion *Populus* angepasst, oder es ist auf die Versuchsdurchführung zurückzuführen.

Schlussfolgerungen

Die Infektionsversuche verschiedener Pappelklone unterschiedlicher Sektionen zur Analyse des Toleranzspektrums der verwendeten Klone und zur Wahl geeigneter *Melampsora*-Sporen für die Infektionsversuche zum Nachweis einer Resistenzveränderung in modifizierten

Pappelklonen der Sektion *Populus* ergab, dass sich der sequenzierte *Melampsora larici-populina*-Stamm nicht für die Infektionsversuche mit modifizierten Pappellinien der Sektion *Populus* eignete. In den Versuchen konnten Anfälligkeiten gegenüber des Inokulates in der Sektion *Populus* in Form einer nekrotischen Abwehrreaktion nachgewiesen werden, jedoch war der zur Transformation verwendete Pappelklon INRA 717-1B4 (*P. × canescens*, P1) im Mittel lediglich mit ca. 4 % durch Nekrose bedeckter Blattfläche gering anfällig auf das Inokulat. Sporenlager wurden auf P1 nicht ausgebildet. Der *Melampsora larici-tremulae*-Stamm zeigte auf P1 Sporenlager, nahm maximal jedoch 35 % weniger Blattfläche ein als die maximale Infektion auf anderen Klonen unter Verwendung des *Melampsora larici-populina* Stammes.

4.6.2 Resistenzveränderung in *NFP-like* modifizierten Pappeln

Zur Analyse einer veränderten Resistenz gegenüber *Melampsora spec.* wurden Infektionsversuche mit CRISPR/Cas9 modifizierten Kandidatenlinien durchgeführt. Es wurden sieben Linien untersucht, die in *NFP-like1* eine Modifikation und bei der *in silico*-Analyse ein vorzeitiges Stopcodon erzeugen. Die resultierende Proteinelänge lag bei allen Linien bei unter 23 %. Vorangegangene Studien zeigten, dass mRNAs, die bei 20 %, 40 % oder 60 % ein vorzeitiges Stopcodon aufwiesen, instabil waren und abgebaut wurden (Isshiki *et al.*, 2001). Anhand der Proteinelänge des nicht-modifizierten Gens kann bei den modifizierten Linien die Gesamtlänge des translatierbaren Proteins bestimmt werden. Die Gesamtlänge der modifizierten Proteine beträgt 14,5–22,9 % des nicht-modifizierten Gens, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Proteine nicht prozessiert werden. Eine Ausnahme ist die Linie N481-44 in der eine Modifikation nur auf einem Allel eine verkürzte mRNA erzeugt, sodass die vorhandene Menge von *NFP-like1* eventuell reduziert und nicht vollständig aufgehoben ist.

Außerdem wurden zwei Linien untersucht, die eine Modifikation in *NFP-like3* und *NFP-like4* aufwiesen. In der Linie N482-24 ist die Ausbildung des *NFP-like3*- und *NFP-like4*-Proteins möglich, sodass die Anfälligkeit dem Kontroll-Klon P1 entsprechen kann. N482-47 hat in *NFP-like3* und *NFP-like4* ein vorzeitiges Stopcodon, das zum Abbruch der Proteinsynthese führen kann. Allerdings sind Proteine ohne ein Signalpeptid auf einem anderen Leseraster möglich. Wenn die Proteine *NFP-like3* und *NFP-like4* ohne Signalpeptid funktionslos sind und beide Gene in die Ausbildung einer Resistenz gegenüber *Melampsora larici-tremulae* involviert sind, sollte für die Linie N482-47 eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber dem verwendeten *Melampsora larici-tremulae*-Stamm vorliegen.

4 Diskussion

Sofern alle drei *NFP-like*-Kandidatengene in die Ausbildung einer Resistenz involviert sind, sollte eine gesteigerte Anfälligkeit ausschließlich in den transgenen Linien N483-8, N484-3 und N484-6 vorliegen, die in allen Kandidatengenen modifiziert sind. In Abbildung 4.2 ist die hypothetische Infektionsstärke bei Verlust der Kandidatengene angegeben. Sofern *NFP-like1* als einziges Gen in die Abwehr gegenüber *Melampsora spec.* involviert ist, sollte eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber dem verwendeten *Melampsora larici-tremulae*-Stamm detektiert werden. Dies müsste dementsprechend in den dreifachmodifizierten Linien ebenfalls zu beobachten sein (Abbildung 4.2 Modell A). Gleiches war für eine Resistenzvermittlung von *NFP-like3* und *NFP-like4* zu erwarten (Abbildung 4.2 Modell B). Eine weitere Möglichkeit bestand darin, dass ein Zusammenspiel aller Kandidatengene einen Effekt auf die Resistenz zeigt (Abbildung 4.2 Modell C) oder dass keines der Gene eine Auswirkung auf die Resistenz hat und ihnen eine andere Funktion im Organismus zukommt (Abbildung 4.2 Modell D).

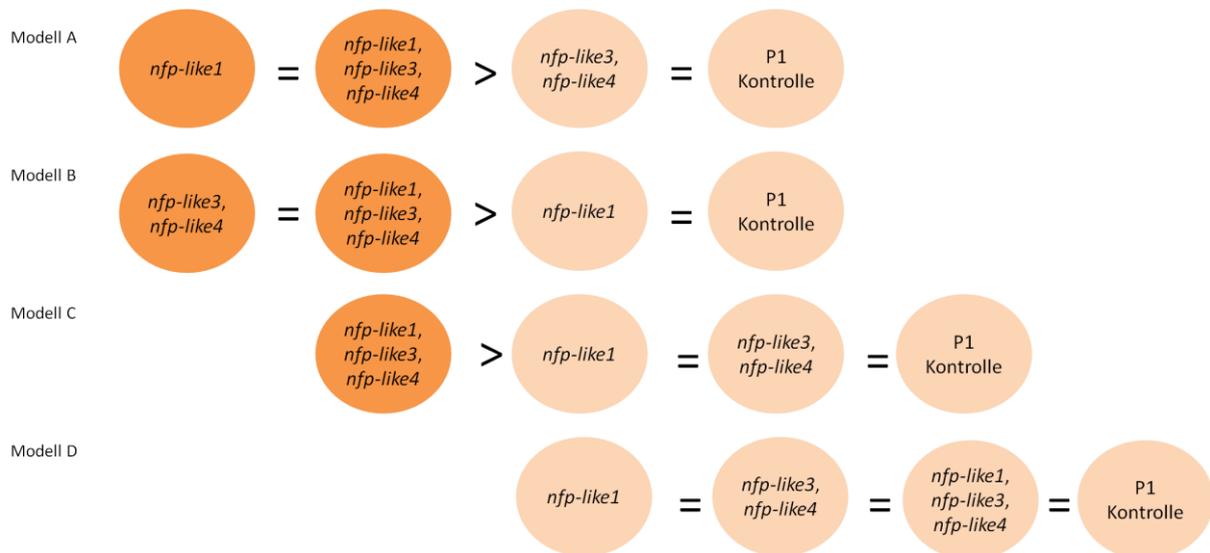


Abbildung 4.2: Hypothetische Infektionsverteilung

Dargestellt ist die erwartete Infektionsstärke in Abhängigkeit welches Kandidatengen eine Rolle bei der Ausbildung einer Resistenz gegenüber *Melampsora spec.* inne hat. Modell A: *NFP-like1*-vermittelte Resistenz ohne Funktion von *NFP-like3* und *NFP-like4*, sodass *nfp-like1* sowie *nfp-like1*, *nfp-like3* und *nfp-like4* modifizierte Linien eine stärkere Infektion zeigen, als *nfp-like3* und *nfp-like4* modifizierte Linien und der nicht-transformierte Kontroll-Klon P1; Modell B: *NFP-like3* und *NFP-like4*-vermittelte Resistenz ohne Funktion von *NFP-like1*; Modell C: *NFP-like1* *NFP-like3* und *NFP-like4*-vermittelte Resistenz in Kombination, sodass das jeweils andere Paralog die Funktion übernehmen kann; Modell D: Die Kandidatengene haben keinen Effekt auf die Resistenz und entsprechen in ihrer Anfälligkeit dem Kontroll-Klon P1.

Die statistische Analyse des Infektionsversuches ergab, dass die Einzelmodifikation in *NFP-like1* in drei Linien (N481-2, N481-15 und N481-97) nicht-signifikant unterschiedlich in ihrer Verteilung im Vergleich zum Kontroll-Klon P1 waren, wohingegen vier Linien (N481-9,

4 Diskussion

N481-23, N481-33 und N481-44) einen signifikanten Unterschied in der Verteilung zum Kontroll-Klon P1 zeigten. Dies ist verwunderlich, da N481-44 ein funktionsfähiges *NFP-like1*-Allel aufweist und in seiner Anfälligkeit dem Kontroll-Klon P1 entsprechen müsste. Außergewöhnlich war außerdem, dass die Linien mit einem signifikanten Unterschied in ihrer Verteilung zum Kontroll-Klon P1 eine geringere Infektion zeigten. Die Doppelmodifikation ergab, dass die Linie N482-24 in der Verteilung dem nicht-transgenen Kontroll-Klon P1 entsprach. Die Linie N482-47, die in *NFP-like3* und *NFP-like4* modifiziert war, war signifikant unterschiedlich in ihrer Verteilung, jedoch ebenfalls geringer infiziert und widerspricht somit dem hypothetischen Modell einer stärkeren Infektion bei Funktionsverlust von *NFP-like3* und *NFP-like4*. Die Linien N483-8, N484-3 und N484-6 mit einer Modifikation in allen Kandidatengenen waren ebenfalls signifikant geringer infiziert als der nicht-transgene Kontroll-Klon P1.

Es konnte eine erhöhte Resistenz in einigen der *NFP-like1* modifizierten Linien sowie in der *NFP-like3* und *NFP-like4* modifizierten Linie und in den Linien, in denen alle Kandidatengene modifiziert waren, nachgewiesen werden. Sollten diese Gene in die Ausbildung der Resistenz involviert sein, würde, wie in Abbildung 4.2 dargestellt, eine erhöhte Anfälligkeit erwartet. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis wäre, dass durch den Verlust der *NFP-like*-Gene ein analoges Gen, das ebenfalls eine Funktion in der Ausbildung der Resistenz inne hat, induziert oder vermehrt synthetisiert wird.

El-Brolosy *et al.* (2019) beobachteten, dass in Zebrafisch sieben Mutanten eine erhöhte mRNA-Expression von paralogen Genen oder deren Familienmitgliedern aufwiesen. Die genannten Mutanten zeigten entweder ein vorzeitiges Stopcodon in den Genen oder das letzte Exon war nicht vorhanden (El-Brolosy *et al.*, 2019). Horváth *et al.* (2020) zeigten, dass in *Arabidopsis Knockout*-Linien ein verändertes Expressionsmuster von einigen *GSTU* in *GSTU-Knockout*-Linien zu finden waren, die die Wildtypsituation in den transgenen Linien wieder herstellten. In den erzeugten *nfp-like* Mutanten wurden vorzeitige Stopcodonen erzeugt, sodass dies eine mögliche Erklärung für eine gesteigerte Resistenz in den transgenen *NFP-like* Linien sein könnte. Mutmaßlich ist eine oder mehrere LysM-Rezeptor-ähnliche Kinasen, die vermutlich in die Ausbildung einer Resistenz involviert sind hoch reguliert. Eine weitere Möglichkeit besteht in alternativem Spleißen, das dazu führt, dass die Mutation keine oder nur eine geringe Auswirkung auf den Organismus hat (Smits *et al.*, 2019). Ebenso könnte eine erneute Transkriptionsinitiierung oder ein schwacher *Nonsense Mediated Decay*-Mechanismus verhindert haben, dass ein gänzlicher *Knockout* des Gens vorliegt (Smits *et al.*, 2019).

Schlussfolgerungen

Die Infektionsversuche zeigten keine gesteigerte Anfälligkeit gegenüber *Melampsora larici-tremulae* bei einem Verlust eines oder mehrerer *NFP-like*-Kandidatengene. Hervorzuheben sind insbesondere die Linien mit einem mutmaßlichen Funktionsverlust nach CRISPR/Cas9-Modifikation von *NFP-like1*, bei dem drei der sieben Linien in ihrer Anfälligkeit nicht unterschiedlich zum Kontroll-Klon P1 und die verbliebenen Linien geringer infiziert waren. Da die Infektionsraten gering waren und die maximal befallene Blattfläche lediglich 25 % betrug, sollten die Versuche nochmals mit einer erhöhten Sporenmenge durchgeführt werden, um die gewonnenen Ergebnisse erneut vergleichend zu untersuchen. Anhand der gewonnenen Ergebnisse kann vermutet werden, dass durch die CRISPR/Cas9-induzierte Modifikation eines oder mehrerer *NFP-like*-Kandidatengene die Resistenz gegenüber *Melampsora larici-tremulae* gesteigert wird. Zum Nachweis, ob bei einem Verlust eines oder mehrere Gene andere Resistenz-vermittelnde Gene hochreguliert werden, wären Transkriptomanalysen nötig.

4.7 Ausblick

Die CRISPR/Cas9 bedingten Modifikationsanalysen der *NFP-like*-Kandidatengene haben Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion dieser Gene in der Pappel gegeben. Anhand der Expressionsanalysen kann vermutet werden, dass *NFP-like3* und *NFP-like4* eine wurzelspezifische Funktion zukommt, jedoch kann eine weitere Funktion in anderen Geweben nicht ausgeschlossen werden. Weiterhin implizieren die Expressionsstudien, dass *NFP-like1* in *P. × canescens* keine Funktion in den untersuchten Geweben Blatt, Sprossachse und Wurzeln zukommt. Außerdem konnte das paraloge Gen *NFP-like2* nicht nachgewiesen werden. Zu einer weiteren Analyse der Funktion von *NFP-like1* könnten weitere Expressionsstudien in anderen Geweben durchgeführt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die gewählten, möglicherweise an der Ausbildung einer Symbiose mit mykorrhizierenden Pilzen beteiligten Kandidatengene durch CRISPR/Cas9 modifiziert werden konnten. Dabei konnten die Kandidatengene in dem Maße modifiziert werden, dass wahrscheinlich keine funktionalen Proteine gebildet werden. Zur Analyse, ob die Proteine tatsächlich nicht gebildet werden, könnten Protein-Aufreinigungen durchgeführt werden. Wenn modifizierte Proteine aus pflanzlichem Gewebe gewonnen werden, werden spezifische Antikörper zum Nachweis der Proteine im Western-Blot benötigt. Erstrebenswert ist ein universeller Antikörper, das heißt pro Gen ein Antikörper, für das

4 Diskussion

sowohl mögliche verkürzte als auch die nicht-modifizierten Proteine nachwiesen werden können. Alternativ könnten die modifizierten Sequenzen in *Escherichia coli* transformiert und die Proteine synthetisiert werden. In diesem Fall müssten die Proteine mit einem Polyhistidin-Tag für eine Aufreinigung gekoppelt werden. Über diesen Nachweis könnte bestimmt werden, ob die Proteine synthetisiert werden.

Der Nachweis einer Modifizierung in zwei Kandidatenlinien ergab unter den gewählten Versuchsbedingungen keine Veränderung in der Mykorrhizierungsrate in editierten Pappeln, bei denen ein *Knockout* von *NFP-like1* sowie *NFP-like1*, *NFP-like3* und *NFP-like4* in Kombination erzielt wurde. Zum Ausschluss, dass das verwendete Inokulat für den Versuchsansatz zur Überprüfung einer veränderten Mykorrhizierung in den transgenen Linien ungeeignet war, sollte der Versuch nochmals mit geeigneten Mykorrhiza-Substraten, vorzugsweise als Einzelkulturen, wiederholt werden.

Ebenso die Rolle der *NFP-like*-Kandidatengene beim Resistenzverhalten gegenüber *Melampsora spec.* müsste in weiteren Studien vertieft werden. Die in dieser Arbeit durchgeführten Resistenztests legen die Vermutung nahe, dass über den Verlust der Kandidatengene andere Resistenz-vermittelnde Gene hoch reguliert werden. Diese Hypothese könnte über Transkriptomanalysen nach Inokulation mit *Melampsora*-Sporen getestet werden. Eine Funktion der *NFP-like* Kandidatengene in der Pappel für die Ausbildung einer Symbiose mit Mykorrhizen oder Resistenz gegenüber *Melampsora larici-tremulae* konnte abschließend weder bestätigt noch widerlegt werden.

5. Literaturverzeichnis

Abuzinadah, R. A. und Read, D. J. (1986). The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. *New Phytologist* 103(3): 481–493.

Agrios G. N. (2009). Plant pathogens and disease: General introduction. *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*, Academic Press: 613–646.

Amor, B. B., Shaw, S. L., Oldroyd, G. E. D., Maillet, F., Penmetsa R. V., Cook, D., Long S. R. Dénarié, J. und Gough, C. (2003). The *NFP* locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation [published correction appears in *Plant J.* 2003 35(1):140]. *Plant J.* 34(4): 495–506.

Andronescu, M., Condon, A., Hoos, H. H., Mathews, D. H. und Murphy, K. P. (2007). Efficient parameter estimation for RNA secondary structure prediction. *Bioinformatics* 23(13): 19–28.

Antolin-Llovera, M., Ried, M. K., Binder, A. und Parniske, M. (2012). Receptor kinase signaling pathways in plant-microbe interactions. *Annu Rev Phytopathol* 50: 451–473.

Arrighi, J.-F., Barre, A., Ben Amor, B., Bersoult, A., Soriano, L. C., Mirabella, R., de Carvalho-Niebel, F., Journet, E. P., Ghérardi, M., Huguet, T., Geurts, R., Dénarié, J., Rougé, P. und Gough, C. (2006). The *Medicago truncatula* lysin [corrected] motif-receptor-like kinase gene family includes *NFP* and new nodule-expressed genes. *Plant physiology* 142(1): 265–279.

Azzeze, A. und Busov V. (2021). CRISPR/Cas9-mediated single and biallelic knockout of poplar *STERILE APETALA (PopSAP)* leads to complete reproductive sterility. *Plant Biotechnology Journal* 19: 23–25.

Bahram, M., Pölme, S., Kõljalg, U. und Tedersoo, L. (2011). A single European aspen (*Populus tremula*) tree individual may potentially harbour dozens of *Cenococcum geophilum* ITS genotypes and hundreds of species of ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 75: 313–320.

Baldacci-Cresp, F., Sacré, P.-Y., Twyffels, L., Mol, A., Vermeersch, M., Ziemons, E., Hubert, P., Pérez-Morga, D., el Jaziri, M., Engler, J. A. und Baucher, M. (2016). Poplar–root knot nematode interaction: a model for perennial woody species. *Mol Plant-Microbe Interact* 29: 560–572.

Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A. und Horvath P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315(5819): 1709–1712.

Becker R., Röhricht, C., Ruscher, K., und Jäkel, K. (2014). Schnellwachsende Baumarten im Kurzumtrieb Anbauempfehlungen. *Sächsisches Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie* 1–27

Beringer, J. E., Brewin, N., Johnston, A. W., Schulman, H. M. und Hopwood, D. A. (1979). The Rhizobium-legume symbiosis. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 204(1155): 219–233.

5. Literaturverzeichnis

- Bewg, W. P., William, P. und Tsai, C.-J.** (2018). Genome editing in trees: from multiple repair pathways to long-term stability. *Frontiers in Plant Science* 9: 1732.
- Bhattacharya, D. und Van Meir, E.G.** (2019). A simple genotyping method to detect small CRISPR-Cas9 induced indels by agarose gel electrophoresis. *Sci Rep* 9: 4437
- BLE** (2019). Die Pappel Klone, Klonmischungen und Familieneltern. *B. f. L. u. Ernährung*: 1-7.
- Bojarczuk, K., Karliński, L., Hazubska-Przybył, T. und Kieliszewska-Rokicka, B.** (2015). Influence of mycorrhizal inoculation on growth of micropropagated *Populus × canescens* lines in metal-contaminated soils. *New Forests* 46: 195–215.
- Boller, T. und Felix, G.** (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60: 379–406.
- Bonfante P. und Anca I.-A.** (2009). Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annual Review of Microbiology* 63: 363–383.
- Bonfante, P.** (2001). At the interface between mycorrhizal fungi and plants: the structural organization of cell wall, plasma membrane and cytoskeleton. Fungal Associations. *Springer Berlin Heidelberg* 45-61.
- Bortesi, L., Zhu, C., Zischewski, J., Perez, L., Bassié, L., Nadi, R., Forni, G., Lade, S. B., Soto, E., Jin, X., Medina, V., Villorbina, G., Muñoz, P., Farré, G., Fischer, R., Twyman, R. M., Capell, T., Christou, P. and Schillberg, S.** (2016). Patterns of CRISPR/Cas9 activity in plants, animals and microbes. *Plant Biotechnol J.* 14(12): 2203–2216.
- Bradshaw, H., Ceulemans, R., Davis, J. und Stettler, R.** (2000). Emerging model systems in plant biology: poplar (*Populus*) as a model forest tree. *J Plant Growth Regul.* 19: 306–313.
- Broghammer, A., Krusell, L., Blaise, M., Sauer, J., Sullivan, J. T., Maolanon, N., Vinther, M., Lorentzen, A., Madsen, E. B., Jensen, K. J., Roepstorff, P., Thirup, S., Ronson, C. W., Thygesen, M. B. und Stougaard, J.** (2012). Legume receptors perceive the rhizobial lipochitin oligosaccharide signal molecules by direct binding. *PNAS* 109(34):13859–13864.
- Bruegmann, T. und 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: 1413–1421.
- Bruegmann, T. und Fladung, M.** (2019). Genomeditierung in Bäumen. *AFZ-der Wald* 5: 16–18.
- Bruegmann, T., Deecke, K., und Fladung, M.** (2019). Evaluating the efficiency of gRNAs in CRISPR/Cas9 mediated genome editing in poplars. *Int J Mol Sci* 20(15): 3623.
- Bruegmann, T., Wetzel, H., Hettrich, K., Smeds, A., Willfor, S., Kersten, B. und Fladung, M.** (2019). Knockdown of *PCBER1*, a gene of neolignan biosynthesis, resulted in increased poplar growth. *Planta* 249(2): 515–525.

5. Literaturverzeichnis

- Brunaud, V., Balzergue, S., Dubreucq, B., Aubourg, S., Samson, F., Chauvin, S., Bechtold, N., Cruaud, C., DeRose, R., Pelletier, G., Lepiniec, L., Caboche, M. und Lecharny, A.** (2002). T-DNA integration into the *Arabidopsis* genome depends on sequences of pre-insertion sites. *EMBO Rep.* 3(12):1152–7.
- Buendia, L., Girardin, A., Wang, T., Cottret, L. und Lefebvre, B.** (2018). LysM receptor-like kinase and LysM receptor-like protein families: an update on phylogeny and functional characterization. *Frontiers in Plant Science* 9:1531.
- Buist, G., Steen, A., Kok, J., und Kuipers, O. P.** (2008). LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans. *Mol Microbiol* 68(4): 838–847.
- Cairney, J. W. G. und Chambers, S. M.** (1997). Interactions between *Pisolithus tinctorius* and its hosts: a review of current knowledge. *Mycorrhiza* 7(3): 117–131.
- Casieri, L., Lahmidi, N. A., Doidy, J., Veneault-Fourrey, C., Migeon, A., Bonneau, L., Courty, P.-E., Garcia, K., Charbonnier, M., Delteil, A., Brun, A., Zimmermann, S., Plassard, C. und Wipf, D.** (2013). Biotrophic transportome in mutualistic plant-fungal interactions. *Mycorrhiza* 23: 597–625.
- Chang, S., Puryear, J., and Cairney, J.** (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* 11(2): 113–116.
- Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., und Staskawicz, B. J.** (2006). Host-Microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124(4): 803–814.
- Cronk, Q. C. B.** (2005). Plant eco-devo: the potential of poplar as a model organism. *New Phytologist* 166: 39–48.
- Cullimore, J. V., Ranjeva, R. und Bono, J. J.** (2001). Perception of lipochitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends Plant Sci.* 6(1):24–30.
- de Bary A.** (1879). Die Erscheinung Der Symbiose. Vortrag, Gehalten auf der Versammlung Deutscher Naturforscher und Aerzte zu Cassel, Strassburg, *Verlag von Karl J. Trübner*, 4–40.
- Deecke, K. und Fladung, M.** (2021). *Melampsora* Resistenztests in Pappeln, AFZ Wald 76(4): 26–29.
- De Jonge R. und Thomma B. P. H. J.** (2009). Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity? *Trends in Microbiology* 17 (4): 151–157.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A. , Eckert, M. R., Vogel, J. und Charpentier, E.** (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471(7340): 602–607.
- Desaki, Y., Miyata, K., Suzuki, M., Shibuya, N. und Kaku, H.** (2018). Plant immunity and symbiosis signaling mediated by LysM receptors. *Innate Immunity* 24(2): 92–100.
- Deveau, H., Barrangou, R., Garneau, J. E., Labonté, J., Fremaux, C., Boyaval, P., Romera, D. A., Horvath, P. und Moineau S.** (2008). Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of bacteriology* 190(4): 1390–1400.

5. Literaturverzeichnis

- Deveau, H., Garneau, J. E. und Moineau S.** (2010). CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. *Annual Review of Microbiology* 64(1): 475–493.
- Dickmann, D. I.** (2006). Silviculture and biology of short-rotation woody crops in temperate regions: then and now. *Biomass and Bioenergy* 30: 696–705.
- DiFazio, S. P., Slavov, G. T. und Joshi, C. P.** (2011). Populus: a premier pioneer system for plant genomics. In: Joshi CP, editor. Genetics, genomics and breeding of poplar. Lebanon: *Science Publishers Inc*: 1–28.
- Ding, L., Chen, Y., Ma, Y., Wang, H. und Wie, H.** (2020). Effective reduction in chimeric mutants of poplar trees produced by CRISPR/Cas9 through a second round of shoot regeneration. *Plant Biotechnol Rep*
- Doench, J. G., Hartenian, E., Graham, D. B., Tothova, Z., Hegde, M., Smith, I., Sullender, M., Ebert, B. L., Xavier R. J. und Root, D. E.** (2014). Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nat Biotechnol* 32(12): 1262–1267.
- Doudna, J. A. und Charpentier, E.** (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346(6213): 1258096.
- Douhan, G. W. und Rizzo, D. M.** (2005). Phylogenetic divergence in a local population of the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum*. *New Phytol* 166(1): 263–271.
- Dowkiw, A., Husson, C., Frey, P., Pinon, J. und Bastien, C.** (2003). Partial resistance to *Melampsora larici-populina* leaf rust in hybrid poplars: genetic variability in inoculated excised leaf disk bioassay and relationship with complete resistance. *Phytopathology*TM 93(4): 421–427.
- Dumolin, S., Demesure, B. und Petit, R. J.** (1995). Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. *Theoretical and Applied Genetics* 91(8): 1253–1256.
- Dunn, P. H., Barro, S. C. und Poth, M.** (1985). Soil moisture affects survival of microorganisms in heated chaparral soil. *Soil Biology and Biochemistry* 17(2): 143–148.
- Duplessis, S., Major, I., Martin, F. und Séguin, A.** (2009). Poplar and pathogen interactions: Insights from *Populus* genome-wide analyses of resistance and defense gene families and gene expression profiling. *Critical Reviews in Plant Sciences* 28(5): 309–334.
- Duplessis, S., Major, I., Martin, F. und Séguin, A.** (2009). Poplar and pathogen interactions: insights from populus genome-wide analyses of resistance and defense gene families and gene expression profiling. *Critical Reviews in Plant Science* 28:309–334,
- Eckenwalder, J. E.** (1996). Systematics and evolution of *Populus*. Biology of *Populus* and its implications for management and conservation. Ottawa, ON, Canada, *NRC Research Press*: 7–32.
- Egil, S. und Brunner, I.** (2011). Mykorrhiza eine faszinierende Lebensgemeinschaft im Wald. *Merkbl. Prax.* 35: 1–8.

5. Literaturverzeichnis

- El-Brolosy, M. A., Kontarakis, Z, Rossi, A., Kuenne, C., Gunther, S., Fukuda, N., Kikhi, K., Boezio, G. L. M., Takacs, C., Lai, S.-L., Fukuda, R., Gerri, C., Giraldez, A. J. und Stainier, D. Y. R.** (2019). Genetic compensation triggered by mutant mRNA degradation. *Nature* 568(7751): 193–197.
- Elmayan, T., und Vaucheret, H.** (1996). Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. *The Plant Journal*, 9: 787–797.
- Elorriaga, E., Klocko, A. L., Ma C. und Strauss S. H.** (2018). Variation in mutation spectra among CRISPR/Cas9 mutagenized poplars. *Front. Plant Sci.* 9:594
- Fan, D., Liu, T., Li, C., Jiao, B., Li, S., Hou, Y. und Luo, K.** (2015). Efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Populus* in the first generation. *Scientific Reports* 5(1): 12217.
- Feau, N., Vialle, A., Allaire, M., Tanguay, P., Joly, D. L., Frey, P., Callan, B. E. und Hamelin, R. C.** (2009). Fungal pathogen (mis-) identifications: a case study with DNA barcodes on *Melampsora* rusts of aspen and white poplar. *Mycol Res* 113(Pt 6-7): 713–724.
- Feng, Z., Mao, Y., Xu, N., Zhang, B., Wei, P, Yang, D.-L., Wang, Z., Zhang, Z., Zheng, R., Yang, L., Zeng, L., Liu, X. and Zhu, J.-K.** (2014). Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*. *PNAS* 111 (12): 4632–4637.
- Feng, Z., Zhang, B., Ding, W., Liu, X., Yang, D.-L., Wie, P., Cao, F., Zhu, S., Zhang, F., Mao, Y. und Zhu, J.-K.** (2013). Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res* 23:1229–1232.
- Fillatti, J. J., Smeller, J., McCown, B., Haissig, B. und Comai, L.** (1987). Agrobacterium mediated transformation and regeneration of *Populus*. *Mol. Gen. Genet.* 206:192–199
- Fink, W., Dreising, H. und Mendgen K.** (1989). Rostpilze: Ihre Entwicklung und Interaktion mit Wirts- und Nichtpflanzen. *Forum Mikrobiologie* 10: 437-443.
- Fladung, M. and Ahuja, M. R.** (1995). "Sandwich" method for nonradioactive hybridization. *Biotechniques* 18(5).
- Fladung, M., Kumar, S. und Ahuja, M. R.** (1997). Genetic transformation of *Populus* genotypes with different chimaeric gene constructs: transformation efficiency and molecular analysis. *Transgenic Research* 6(2): 111–121.
- Force, A., Lynch, M., Pickett, F. B., Amores, A., Yan, Y.-l. und Postlethwait, J.** (1999). Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* 151: 1531–1545
- Frank B.** (1885). Ueber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 3: 128–145.
- Frey, P., Gérard, P., Feau, N., Husson, C. und Pinon, J.** (2005). Variability and population biology of *Melampsora* rusts on poplars. *Rust diseases of willow and poplar*: 63–72.

5. Literaturverzeichnis

- Fu, Y., Foden, J. A., Khayter, C., Maeder, M. L., Reyon, D., Joung, J. K. und Sander, J. D.** (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature biotechnology* 31(9): 822–826
- Gagnon, J. A., Valen, E., Thyme, S. B., Huang, P., Akhmetova, L., Pauli, A., Montague, T. G., Zimmerman, S., Richter, C. und Schier, A. F.** (2014). Efficient mutagenesis by Cas9 protein-mediated oligonucleotide insertion and large-scale assessment of single-guide RNAs. *PLoS one* 9(5)
- Garcia, K., Chasman, D., Roy, S. und Ané J.-M.** (2017). Physiological responses and gene co-expression network of mycorrhizal roots under K⁺ deprivation. *Plant Physiology*, 173: 1811–1823
- Gardes, M. und Bruns, T. D.** (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 2(2): 113–118.
- Garvey, K. J., Saedi, M. S. und Ito, J.** (1986). Nucleotide sequence of *Bacillus phage* Φ29 genes 14 and 15: homology of gene 15 with other phage lysozymes. *Nucleic Acids Research* 14 (24): 10001–10008
- Genre, A., Chabaud, M., Balzergue, C., Puech-Pagés, V., Novero, M., Rey, T., Fournier, J., Rochange, S., Bécard, G., Bonfante, P. und Barker, D. G.** (2013). Short-chain chitin ligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca²⁺ spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. *New Phytologist* 198: 179–189.
- Gerard, P. R., Husson, C., Pinon, J. und Frey, P.** (2006). Comparison of genetic and virulence diversity of *Melampsora larici-populina* populations on wild and cultivated poplar and influence of the alternate host. *Phytopathology* 96(9): 1027–1036.
- Gomez, S. K., Javot, H., Deewatthanawong, P., Torres-Jerez, I., Tang, Y., Blancaflor, E. B., Udvardi, M. K. und Harrison, M. J.** (2009). *Medicago truncatula* and *Glomus intraradices* gene expression in cortical cells harboring arbuscules in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *BMC plant biology* 9: 10.
- Gruber, A., Lorenz, R., Bernhart, S., Neuböck, R. und Hofacker, I.** (2008). The vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Res* 36: 70–74.
- Gust, A. A., Willmann, R., Desaki, Y., Grabherr, H. M. und Nürnberger, T.** (2012). Plant LysM proteins: modules mediating symbiosis and immunity. *Trends in Plant Science* 17 (8): 495–502.
- Gust, A. A., Willmann, R., Desaki, Y., Grabherr, H. M. und Nürnberger, T.** (2012). Plant LysM proteins: modules mediating symbiosis and immunity. *Trends in Plant Science* 17 (8): 495–502
- Hacquard, S., Joly, D. L., Lin, Y.-C., Tisserant, E., Feau, N., Delaruelle, C., Legué, V., Kohler, A., Tanguay, P., Petre, B., Frey, P., Van de Peer, Y., Rouzé, P., Martin, F., Hamelin, R. C. und S. Duplessis** (2012). A comprehensive analysis of genes encoding small secreted proteins identifies candidate effectors in *Melampsora larici-populina* (Poplar leaf rust). *Molecular Plant-Microbe Interactions*® 25(3): 279–293.

5. Literaturverzeichnis

- Hellens, R., Mullineaux, P. und Klee, H.** (2000). Technical focus: a guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends Plant Sci* 5(10): 446–451.
- Horváth, E., Bela, K., Gallé, A., Riyazuddin R., Csomor, G., Csenki, D. und Csiszár, J.** (2020). Compensation of mutation in *Arabidopsis* glutathione transferase (*AtGSTU*) genes under control or salt stress conditions. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 2349.
- Husson, C., Ioos, R., Andrieux, A. und Frey, P.** (2013). Development and use of new sensitive molecular tools for diagnosis and detection of *Melampsora* rusts on cultivated poplar. *Forest Pathology* 43(1): 1–11.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. und Nakata, A.** (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology* 169(12): 5429–5433.
- Isshiki, M., Yamamoto, Y., Satoh, H. und Shimamoto, K.** (2001). Nonsense-Mediated Decay of mutant *waxy* mRNA in Rice. *Plant Physiology* 125(3): 1388–1395.
- Jansen, R., van Embden, J. D. A., Gaastra, W. und Schouls, L. M.** (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology* 43(6): 1565–1575.
- Jeffries, P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Turnau, K. und Barea J.-M.** (2003). The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biol Fertil Soils*, 37:1–16.
- Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F. und Marraffini, L. A.** (2013). RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature biotechnology* 31(3): 233–239.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. und Charpentier, E.** (2012). A programmable Dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337(6096): 816–821.
- Jones, J. D. G. und Dangl, J. L.** (2006). The plant immune system. *Nature* 444(7117): 323–329.
- Jore, M. M., Brouns, S. J. J. und van der Oost, J.** (2012). RNA in defense: CRISPRs protect prokaryotes against mobile genetic elements. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4(6).
- Jouanin, L., Brasileiro, A. C. M., Leplé, J. C., Pilate, G. und D Cornu, D.** (1993). Genetic transformation: a short review of methods and their applications, results and perspectives for forest trees. *Ann. For. Sci.* 50 (4): 325–336.
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E. und Shibuya, N.** (2006). Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *PNAS* 103 (29): 11086–11091.
- Kaldorf, M., Renker, C., Fladung, M. und Buscot, F.** (2004). Characterization and spatial distribution of ectomycorrhizas colonizing aspen clones released in an experimental field. *Mycorrhiza* 14: 295–306.

5. Literaturverzeichnis

- Karliński, L., Rudawska, M., Kieliszewska-Rokicka, B. und Leski, T.** (2010). Relationship between genotype and soil environment during colonization of poplar roots by mycorrhizal and endophytic fungi. *Mycorrhiza* 20(5): 315–324.
- Karp, A. und Shield, I.** (2008). Bioenergy from plants and the sustainable yield challenge. *New Phytologist* 179: 15–32.
- Kauter, D., Lewandowski, I. und Claupein, W.** (2003). Quantity and quality of harvestable biomass from *Populus* short rotation coppice for solid fuel use—a review of the physiological basis and management influences. *Biomass and Bioenergy* 24: 411–427.
- Kessler, A. und Baldwin, I. T.** (2002). Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 299–328.
- Kipfer, T., Egli, S., Ghazoul, J., Moser, B. und Wohlgemuth, T.** (2010). Susceptibility of ectomycorrhizal fungi to soil heating. *Fungal Biol* 114(5-6): 467–472.
- Kumar, S. und Fladung, M.** (2002). Transgene integration in aspen: structures of integration sites and mechanism of T-DNA integration. *The Plant Journal* 31: 543–551.
- Kutscheidt, J.** (2017) Mykorrhiza-Einsatz bei Stadtbäumen sinnvoll? *TASPO Baumzeitung* 2: 16–19.
- Labbé, J., Jorge, V., Kohler, A., Vion, P., Marçais, B., Bastien, C., Tuskan, G. A., Martin, F. und Le Tacon, F.** (2011). Identification of quantitative trait loci affecting ectomycorrhizal symbiosis in an interspecific F1 poplar cross and differential expression of genes in ectomycorrhizas of the two parents: *Populus deltoides* and *Populus trichocarpa*. *Tree Genetics & Genomes* 7: 617–627.
- Labbé, J., Muchero, W., Czarnecki, O., Wang, J., Wang, X., Bryan, A. C., Zheng, K., Yang, Y., Xie, M., Zhang, J., Wang, D., Meidl, P., Wang, H., Morrell-Falvey, J. L., Cope, K. R., Maia, L. G. S., Ané, J.-M., Mewalal, R., Jawdy, S. S., Gunter, L. E., Schackwitz, W., Martin, J., Le Tacon, F., Li, T., Zhang, Z., Ranjan, P., Lindquist, E., Yang, X., Jacobson, D. A., Tschapinski, T. J., Barry, K., Schmutz, J., Chen, J.-G. und Tuskan, G. A.** (2019). Mediation of plant–mycorrhizal interaction by a lectin receptor-like kinase. *Nature Plants* 676 (5): 676–680.
- Langenfeld-Heyser, R., Gao, J., Ducic, T., Tachd, P., Lu, C. F., Fritz, E., Gafur, A. und Polle, A.** (2006). *Paxillus involutus* mycorrhiza attenuate NaCl-stress responses in the salt-sensitive hybrid poplar *Populus × canescens*. *Mycorrhiza* 17:121–131.
- Lei, Y., Lu, L., Liu, H. Y., Li, S., Xing, F. und Chen, L. L.** (2014). CRISPR-P: a web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants. *Mol Plant* 7(9): 1494–1496.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J. C. und Dénarié** (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344: 781–784.
- Liang, G., Zhang, H., Lou, D. und Yu D.** (2016). Selection of highly efficient sgRNAs for CRISPR/Cas9-based plant genome editing. *Sci Rep* 6.

5. Literaturverzeichnis

- Limpens, E., Franken, C., Smit, P., Willemse, J., Bisseling, T. und Geurts, R.** (2003). LysM domain receptor kinases regulating rhizobial nod factor–induced infection. *Science* 203: 630–633.
- Liu, T., Sheng, M., Wang, C. Y., Chen, H., Li, Z. und Tang, M.** (2015). Impact of arbuscular mycorrhizal fungi on the growth, water status, and photosynthesis of hybrid poplar under drought stress and recovery. *Photosynthetica* 53(2): 250–258.
- Lohmann, G. V., Shimoda, Y., Nielsen, M. W., Jørgensen, F. G., Grossmann, C., Sandal, N., Sørensen, K., Thirup, S., Madsen, L. H., Tabata, S., Sato, S., Stougaard, J. und Radutoiu, S.** (2010). Evolution and regulation of the *Lotus japonicus* LysM receptor gene family. *Molecular Plant-Microbe Interactions*® 23(4): 510–521.
- Lopez-Agullion, R. und Garbaye, J.** (1989). Some aspects of a double symbiosis with ectomycorrhizal and VAM fungi. *Agr. Ecosyst. Environ.* 29: 263–266.
- Lühns, R., Efremova, N., Welters, P., Teichmann, T., Fladung, M., Hennig, A., Meier-Dinkel, A. und Janßen, A.** (2015). Entwicklung polyploider Pappellinien von verschiedenen Arten mit Hilfe der Protoplastenfusion. *Thünen Report* 26: 185–191.
- Madsen, E. B., Madsen, L. H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczyglowski, K., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N. und Stougaard, J.** (2003). A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* 425(6958): 637–640.
- Makarova, K. S., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineu, S., Mojica, F. J., Wolf, Y. I., Yakunin, A. F., van der Oost, J. und Koonin, E. V.** (2011). Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology* 9(6): 467–477.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., Saunders, S. J., Barrangou, R., Brouns, S. J., Charpentier, E., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J., Terns, R. M., Terns, M. P., White, M. F., Yakunin, A. F., Garrett, R. A., van der Oost, J., Backofen, R. und Koonin, E. V.** (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology* 13(11): 722–736.
- Maquat, L. E.** (1995). When cells stop making sense: effects of nonsense codons on RNA metabolism in vertebrate cells. *RNA* (New York, N.Y.) 1(5): 453–465.
- Maquat, L. E.** (2005). Nonsense-mediated mRNA decay in mammals. *J. Cell Sci.* 118: 1773–1776.
- Martoglio, B. und Dobberstein, B.** (1998). Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends in Cell Biology* 8 (10): 410–415.
- Marx, D. H.** (1977). Tree host range and world distribution of the extromycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Can J Microbiol* 23(3): 217–223.
- Matzke, M. A., Primig, M., Trnovsky, J. und Matzke, A. J.** (1989). Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. *EMBO J.* 8(3):643–649.

5. Literaturverzeichnis

- Mishiba, K., Nishihara, M., Nakatsuka, T. Abe, Y., Hirano, H., Yokoi, T., Kikudi A. und Yamamura, S.** (2005). Consistent transcriptional silencing of 35S-driven transgenes in gentian. *Plant J.* (4):541–556.
- Miyata, K., Kozaki, T., Kouzai, Y., Ozawa, K., Ishii, K., Asamizu, E., Okabe, Y., Umehara, Y., Miyamoto, A., Kobae, Y., Akiyama, K., Kaku, H., Nishizawa, Y., Shibuya, N., und Nakagawa, T.** (2014). The bifunctional plant receptor, *OsCERK1*, regulates both chitin-triggered immunity and arbuscular mycorrhizal symbiosis in rice. *Plant Cell Physiol.* 55(11): 1864–1872.
- Mou, H., Smith, J.L., Peng, L., Yin, H., Moore, J., Zhang, X.-Q., Song, C.-Q., Sheel, A., Wu, Q., Ozata, D. M., Li, Y., Anderson, D. G., Emerson, C. P., Sontheimer E. J., Moore, M. J., Weng, Z. und Xue, W.** (2017). CRISPR/Cas9-mediated genome editing induces exon skipping by alternative splicing or exon deletion. *Genome Biol* 18: 108.
- Muhr, M., Paulat, M., Awwanah, M., Brinkkötter, M. und Teichmann, T.** (2018). CRISPR/Cas9-mediated knockout of *Populus BRANCHED1* and *BRANCHED2* orthologs reveals a major function in bud outgrowth control. *Tree Physiol.* 38(10):1588–1597.
- Müller, N. A., Kersten, B., Leite Montalvao, A. P., Mähler, N., Bernhardsson, C., Bräutigam, K., Carracedo Lorenzo, Z., Hönicka, H., Kumar, V., Mader, M., Pakull, B., Robinson, K. M., Sabatti, M., Vettori, C., Ingvarsson, P. K., Cronk, Q., Street, N. R. und Fladung, M.** (2020). A single gene underlies the dynamic evolution of poplar sex determination. *Nat Plants* 6: 630–637.
- Nath Radhamony, R., Mohan Prasad, A. und Srinivasan, R.** (2005). T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*: a tool for functional genomics. *Electron J Biotechnol* (online); 8(1).
- Nedelin, T.** (2014). Ectomycorrhiza – nature and significance for functioning of forest ecosystems. *Forestry Ideas* 20: 3–29.
- Nemudryi, A. A., Valetdinova, K. R., Medvedev, S. P. und Zakian, S. M.** (2014). TALEN and CRISPR/Cas genome editing systems: tools of discovery. *Acta naturae* 6(3): 19–40.
- Nilsson, R. H., Kristiansson, E., Ryberg, M. und Larsson, K.-H.** (2005). Approaching the taxonomic affiliation of unidentified sequences in public databases – an example from the mycorrhizal fungi. *BMC Bioinformatics* 6(1): 178.
- Nuñez, J. K., Kranzusch, P. J., Noeske, J., Wright, A. V., Davies, C. W. und Doudna, J. A.** (2014). *Cas1–Cas2* complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR–Cas adaptive immunity. *Nature Structural & Molecular Biology* 21(6): 528–534.
- Oberpichler, I., Rosen, R., Rasouly, A., Vugman, M., Ron, E. Z. und Lamparter, T.** (2008). Light affects motility and infectivity of *Agrobacterium tumefaciens*. *Environ Microbiol* 10(8): 2020–2029.
- Panchy, N., Lehti-Shiu, M., und Shiu, S. H.** (2016). Evolution of gene duplication in plants. *Plant physiology* 171(4): 2294–2316.
- Pandey, P., Irulappan, V., Bagavathiannan M. V. und Senthil-Kumar M.** (2017). Impact of combined abiotic and biotic stresses on plant growth and avenues for crop improvement by exploiting physio-morphological traits. *Frontiers in Plant Science* 8: 537.

5. Literaturverzeichnis

- Park, Y.-D., Papp, I., Moscone, E., Iglesias, V., Vaucheret, H., Matzke, A. und Matzke, M.** (1996), Gene silencing mediated by homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. *The Plant Journal*, 9: 183–194.
- Peña, L. und Séguin, A.** (2001). Recent advances in the genetic transformation of trees. *Trends in Biotechnology* 19 (12): 500–506.
- Pickett, F. B. und Meeks-Wagner, D. R.** (1995). Seeing double: appreciating genetic redundancy. *The Plant Cell*(7): 1347–1356.
- Pinon, J. und Frey, P.** (2005). Interactions between poplar clone and *Melampsora* populations and their implications for breeding for durable resistance. *Rust Diseases of Willow and Poplar*, CAB International 2005, 139–154.
- Pitkaranta, M., Meklin, T., Hyvarinen, A., Paulin, L., Auvinen, P., Nevalainen, A. und Rintala, H.** (2008). Analysis of fungal flora in indoor dust by ribosomal DNA sequence analysis, quantitative PCR, and culture. *Appl Environ Microbiol* 74(1): 233–244.
- Potenza, C., Aleman, L. und Sengupta-Gopalan, C.** (2004). Invited review: targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 40: 1–22.
- Pourcel, C., Salvignol, G. und Vergnaud, G.** (2005). CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* 151(3): 653–663.
- Radutoiu, S., Madsen, L. H., Madsen, E. B., Felle, H. H., Umehara, Y., Grønlund, M., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N. und Stougaard, J.** (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425(6958): 585–592.
- Rasmussen, S. R., Füchtbauer, W., Novero, M., Volpe, V., Malkov, N., Genre, A., Bonfante, P., Stougaard, J. und Radutoiu, S.** (2016). Intraradical colonization by arbuscular mycorrhizal fungi triggers induction of a lipochitoooligosaccharide receptor. *Scientific reports* 6: 29733.
- Rudawska, M., Leski, T., Wilgan, R., Karlinski, L., Kujawska, M. und Janowski, D.** (2018). Mycorrhizal associations of the exotic hickory trees, *Carya laciniosa* and *Carya cordiformis*, grown in Kornik arboretum in Poland. *Mycorrhiza* 28(5-6): 549–560.
- Schardl, C. L. und Craven, K. D.** (2003). Interspecific hybridization in plant-associated fungi and oomycetes: a review. *Molecular Ecology* 12(11): 2861–2873.
- Schmittgen, T. D. und Livak, K. J.** (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3(6): 1101–1108.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M. und Ragg, T.** (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology* 7(1): 3.

5. Literaturverzeichnis

- Shimizu, T., Nakano, T., Takamizawa, D., Desaki, Y., Ishii-Minami, N., Nishizawa, Y., Minami, E., Okada, K., Yamane, H., Kaku, H. und Shibuya, N.** (2010). Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 64(2): 204–214.
- Smith, S. E. und Read D.** (2008). Mycorrhizal symbiosis (Third edition). *Academic Press*
- Smits, A. H, Ziebell, F., Joberty, G., Zinn, N., Mueller, W. F., Clauder-Münster, S., Eberhard, D., Savitski, M. F., Grandi, P., Jakob, P., Michon, A.-M., Sun, H., Tessmer, K., Bürckstümmer, T., Bantscheff, M., Steinmetz, L. M., Drewes, G. und Huber, W.** (2019). Biological plasticity rescues target activity in CRISPR knock outs. *Nat. Methods* 16: 1087–1093.
- Song, G., Jia, M., Chen, K., Kong, X., Khattak, B., Xie, C., Li, A. und Mao, L.** (2016). CRISPR/Cas9: a powerful tool for crop genome editing. *The Crop Journal* 4(2): 75–82.
- Southern, E. M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98(3): 503–517.
- Steenackers, J., Steenackers, M., Steenackers, V. und Stevens M.** (1996). Poplar diseases, consequences on growth and wood quality. *Biomass and Bioenergy* 10: 267–274.
- Stougaard, J.** (2001). Genetics and genomics of root symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* 4(4): 328–335.
- Syed, N. H., Kalyna, M., Marquez, Y., Barta, A. und Brown J. W. S.** (2012). Alternative splicing in plants – coming of age. *Trends in Plant Science* 17 (10): 616–623.
- Tagu, D., Rampant, P. F., Lapeyrie, F., Frey-Klett, P., Vion, P. und Villar, M.** (2001). Variation in the ability to form ectomycorrhizas in the F1 progeny of an interspecific poplar (*Populus spp.*) cross. *Mycorrhiza* 10: 237–240.
- Thomas, J. und Katterman, F.** (1986). Cytokinin activity induced by thidiazuron. *Plant Physiology* 81: 681–683.
- Tian, C.-M., Shang, Y.-Z., Zhuang, J.-Y., Wang, Q., und Kakishima, M.** (2004). Morphological and molecular phylogenetic analysis of *Melampsora* species on poplars in China. *Mycoscience* 45(1): 56–66.
- Trębicki, P., Dader, B., Vassiliadis, S. und Fereres, A.** (2017). Insect–plant–pathogen interactions as shaped by future climate: effects on biology, distribution and implications for agriculture. *Insect Science* 24: 975–989.
- Tuskan, G. A., 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, R. R., Bhalerao, R. P., Blaudez, D., Boerjan, W., Brun, A., Brunner, A., Busov, V., Campbell, M., Carlson, J., Chalot, M., Chapman, J., Chen, G. L., Cooper, D., Coutinho, P. M., 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.,**

5. Literaturverzeichnis

- Kalluri, U., Larimer, F., Leebens-Mack, J., Leplé, J. C., Locascio, P., Lou, Y., Lucas, S., Martin, F., Montanini, B., Napoli, C., Nelson, D. R., 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, C. J., Uebacher, E., Unneberg, P., Vahala, J., Wall, K., Wessler, S., Yang, G., Yin, T., Douglas, C., Marra, M., Sandberg, G., Van de Peer, Y. und Rokhsar, D.** (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313(5793): 1596–1604.
- van Hoof, A. und Green, P. J.** (1996). Premature nonsense codons decrease the stability of phytohemagglutinin mRNA in a position-dependent manner. *The Plant Journal* 10(3): 415–424
- Vialle, A., Feau, N., Allaire, M., Didukh, M., Martin, F., Moncalvo, J. M. und Hamelin, R. C.** (2009). Evaluation of mitochondrial genes as DNA barcode for basidiomycota. *Mol Ecol Resour* 9: 99–113.
- Vialle, A., Feau, N., Frey, P., Bernier, L. und Hamelin, R. C.** (2013). Phylogenetic species recognition reveals host-specific lineages among poplar rust fungi. *Mol Phylogenet Evol* 66(3): 628–644.
- Vialle, A., Frey, P., Hambleton, S., Bernier, L. und Hamelin, R. C.** (2011). Poplar rust systematics and refinement of *Melampsora* species delineation. *Fungal Diversity* 50(1): 227–248.
- Wallace, B. R., Schold, M., Johnson, M. J., Dembek, P. und Itakura, K.** (1981). Oligonucleotide directed mutagenesis of the human β -globin gene: a general method for producing specific point mutations in cloned DNA. *Nucleic Acids Res* 9(15): 3647–3656.
- Wan, J., Zhang, X. C., Neece, D., Ramonell, K. M., Clough, S., Kim, S. Y., Stacey, M. G. und Stacey, G.** (2008). A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 20(2), 471–481.
- Wan, Z., Li, Y., Liu, M., Chen, Y. und Yin, T.** (2015). Natural infectious behavior of the urediniospores of *Melampsora larici-populina* on poplar leaves. *Journal of Forestry Research* 26(1): 225–231.
- Wang, T., Wei, J. J., Sabatini, D. M. und Lander, E. S.** (2014). Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science* (New York, N.Y.) 343(6166), 80–84.
- Weinthal, D., Tovkach, A., Zeevi, V. und Tzfira, T.** (2010). Genome editing in plant cells by zinc finger nucleases. *Trends Plant Sci* 15(6): 308–321.
- White, T. J., Bruns, T., Lee S., und Taylor, J.** (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and applications*, Academic Press, Inc: 315–322.
- Wickham, H.** (2009). ggplot2: elegant graphics for data analysis. *Springer Publishing Company*, Incorporated.
- Wilkins, O., Nahal, H., Foong, J., Provart, N. J. und Campbell, M. M.** (2009). Expansion and diversification of the *Populus* R2R3-MYB family of transcription factors. *Plant Physiology* 149(2): 981–993.

5. Literaturverzeichnis

- Willing, R. R., Pryor, L. D.** (1976). Interspecific hybridisation in poplar. *Theoretical and Applied Genetics* 47: 141–151.
- Wolt, J. D., Wang, K., Sashital, D. und Lawrence-Dill, C.J.** (2016). Achieving plant CRISPR targeting that limits off-target effects. *The Plant Genome* 9: 1–8.
- Wong, N., Liu, W. und Wang, X.** (2015). WU-CRISPR: characteristics of functional guide RNAs for the CRISPR/Cas9 system. *Genome Biology* 16(1): 218.
- Wu, L., Di, D. W., Zhang, D., Song, B., Luo, P. und Guo, G.Q.** (2015). Frequent problems and their resolutions by using thermal asymmetric interlaced PCR (TAIL-PCR) to clone genes in *Arabidopsis* T-DNA tagged mutants. *Biotechnol Biotechnol Equipment* 29(2):260–267.
- Wu, Z. Y.** (1999). Flora of China. Volume 20, Fascicule 2. *Science Press* 7–78.
- Xie, K. und Yang, Y.** (2013). RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR–Cas system. *Molecular Plant* 6(6): 1975–1983.
- Young, N. D., Debelle, F., Oldroyd, G. E. D., Geurts, R., Cannon, S. B., Udvardi, M. K., Benedito, V. A., Mayer, K. F. X., Gouzy, J., Schoof, H., Van de Peer, Y., Proost, S., Cook, D. R., Meyers, B. C., Spannagl, M., Cheung, F., De Mita, S., Gundlach, H., Zhou, S., Mudge, J., Bharti, A. K., Murray, J. D., Naoumkina, M. A., Rosen, B., Silverstein, K. A. T., Tang, H., Rombauts, S., Zhao, P. X., Zhou, P., Barbe, V., Bardou, P., Bechner, M., Bellec, A., Berger, A., Bergès, H., Bidwell, S., Bisseling, T., Choisine, N., Couloux, A., Denny, R., Deshpande, S., Dai, X., Doyle, J. J., Duzde, A.-M., Farmer A. D., Fouteau, S., Franken, C., Gibelin, C., Gish, J., Goldstein, S., González, A. J., Green, P. J., Hallab, A., Hartog, M., Hua, A., Humphary, S. J., Jeong D.-H., Jing, Y., Jöcker, A., Kenton, S. M., Kim, D.-J., Klee, K., Lai, H., Lang, C., Lin, S., Macmil, S., Magdelenat, G., Matthews, L., McCarrison, J., Monaghan, E. L., Mun, J.-H., Najar, F. Z., Nicholson, C., Noirot, C., O’Bleness, M., Paule, J., Prion, F., Qin, D., Qu, C., Retzel, E. F., Riddle, C., Sallet, E., Samain, S., Samson, N., Sanders, I., Saurat, O., Scarpelli, C., Schiex, T., Segurens, B., Severin, A. J., Sherrier, D. J., Shi, R., Sims, S., Singer, S. R., Sinharoy, S., Sterck, L., Viollet, A., Wang, B.-B., Wang, K., Wang, M., Warfsmann, J., Weissenbach, J., White D. D., White, J. D., Wiley, G. B., Wincker, P., Xing, Y., Yang, L., Yao, Z., Ying, F., Zhai, J., Zhou, L., Zuber, A., Dénarié, J., Dixon, R. A., May, G. D., Schwartz, D. C., Rogers, J., Qué-tier, F.,[...] Town, C. D. und Roe B. A.** (2011). The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* 480: 520–524.
- Zhang, B., Liu, F., Liu, Z.-H., Wang, H.-M. und Yao, C.-B.** (2001). Effects of kanamycin on tissue culture and somatic embryogenesis in cotton. *Plant Growth Regulation* 33: 137–149.
- Zhang, X. C., Wu, X., Findley, S., Wan, J., Libault, M., Nguyen, H. T., Cannon, S. B. und Stacey, G.** (2007). Molecular evolution of lysin motif-type receptor-like kinases in plants. *Plant physiology* 144(2): 623–636.
- Zhang, X., Dong, W., Sun, J., Feng, F., Deng, Y., He, Z., Oldroyd, G.E. und Wang, E.** (2015). The receptor kinase *CERK 1* has dual functions in symbiosis and immunity signalling. *Plant J* 81: 258–267.
- Zhang, X.-C., Wu, X., Findley, S., Wan, J., Libault, M., Nguyen, H.T., Cannon, S. B. und Stacey, G.** (2012). Molecular evolution of lysin motif-type receptor-like kinases in plants. *Plant Physiology* 144: 623–636.

5. Literaturverzeichnis

Zhou, X., Jacobs, T.B., Xue, L.-J., Harding, S.A. and Tsai, C.-J. (2015). Exploiting SNPs for biallelic CRISPR mutations in the outcrossing woody perennial *Populus* reveals 4-coumarate:CoA ligase specificity and redundancy. *New Phytol.* 208: 298–301.

Zhukov, V., Radutoiu, S., Madsen, L. H., Rychagova, T., Ovchinnikova, E., Borisov, A., Tikhonovich, I. und Stougaard, J. (2008). The pea Sym37 receptor kinase gene controls infection-thread initiation and nodule development. *Mol Plant Microbe Interact.* 21(12):1600–1608.

Zipfel, C. und Oldroyd, G. E. D. (2017). Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature* 543(7645): 328–336.

Zsuffa, L., Giordano, E., Pryor, L. D. und Stettler, R. F. (1996). Trends in poplar culture: some global and regional perspectives. In: Stettler, R. F., Bradshaw, Jr. H. D., Heilman, P. E., Hinckley, T. M. und editors. *Biology of Populus and its implications for management and conservation*. Ottawa: *NRC Research Press*: 515–539.

Zuker, M. und Stiegler, P. (1981). Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Res* 9(1): 133–148.

6 Anhang

6.1 Sequenzen der Kandidatengene

Im Folgenden sind die zur Analyse der Kandidatengene verwendeten Sequenzen angegeben, die der Tsai AspenDB (<http://aspen.db.uga.edu/index.php/databases/spta-717-genome>) für jedes Kandidatengenen unter Verwendung der *P. × canescens* Genomgrundlage entnommen wurden.

6.1.1 Genomische Sequenzen

NFP-like1 Alba-Allel:

ATGGCAATAT	CTTTGCTCCC	CTTCTTTTCC	ACACAAGCTC	TTCTTCTCTT	GATCCTTTTA	TTTTCTCCCA	CCTATGTCAC
CTCACAAGCA	CCACCTGCCT	CAAACCTTTC	ATGCCTGTG	GATTCACCTA	CCACATGCTC	TACATATTTT	ACTTACCTTG
CCCGGCCACC	AAATTTCTTG	GACCTCGGAA	ACATTTCTGA	TCTATTTGGG	GTCACCTCGTA	AAGAAATAGC	AGCTGCAAGC
AACCTGGAGT	CTGTGGACAC	CCCATTATTT	CCAAATCAAC	TTTTGCTTGT	ACCTAAACCT	TGTGGTTGCA	CCGGTAACCT
ATCTTTTGCC	AATATCACTT	ACCAAATCCA	GCAAGGTGAT	AGCATCTACT	TGGTTTCGAC	TACTTCATTT	GAGAACCTCA
CCCGTTGGCA	AGAGGTGGAA	GCTTTGAACC	CCAGTCTGAC	TCCAACCTC	TTGCATGCTG	GTGACAAGGT	TATATTTCTT
TTGTCTGTA	AGTGCCCTTC	AAAACTCAT	TTGGAAAGAG	GAATTGCTTA	TCTCATTACT	TATGCGTGGC	AACCTAGTGA
TGATCTCACT	AAAGTTGCTG	CTAAACTTAA	TGTCTCTGAA	CGTAGCATTG	TGATTGAGAA	CAACTGTGTG	AACTTTACTG
CTGCAGTCTA	TCTCCCGGTA	TTCATCCCTG	TGTCCCAGTT	GCCAGTTCTC	TCTCAGCAAT	ACCCCTCTCC	TGAAAAGAAGA
GAATCCAGGA	ATCGTTGGAT	CATCATTGTT	GCTGCAAGCA	TTGCAAGCGC	TCTTTTGATC	TTCCTTTTGA	TTGCTTTTCT
GGCCCATAAA	CGTTGTTCAT	ATAAGAGAAC	TAAAGCTTTG	GATCGCACTG	GATCTTGTTT	GAGACCAGCG	ATCTCAATCA
AACAAAGGAA	CTTACAAAAC	TGGAGAGTTT	TGAGGCAAAG	ATGACACCGG	ATAAGCTGCT	TCCAGGGGTT	TCAGGCTATC
TGGGCAAGCC	GATCATTTAT	GAGGTTAAAG	AGATCATGGA	GGGAACGATG	GATCTAAATG	AACATTATAA	GATAGGAGGA
TCAGTATATA	GGGCCAAAAT	CAATGGCAGG	GTCTTGGCAG	TGAAGAAAAC	CAAGGATGAT	GTCACAGAAG	AACTAAAGAT
TTTGCAGAAA	GTCAGTCATG	CAGTCTGGTT	AACTAATGG	GGATGTCATC	TGGATTTGAC	AGAGAAGGAA	ATCGCTTCTT
GGTCTATGAA	TATGCAGAAA	ATAGGTCGCT	AGAAAAGTGG	TTGCATCCCA	TTTCTGAATC	TTCTCAAGC	TCTGCGGGTT
TCCTCACTTG	GAGTCAAAGG	TTACATGTAG	CACTAGATGT	GGCCAATGGC	CTGCAATACA	TGCATGAACA	CACTCAACCA
AGCATCGTTC	ACAAGGATAT	TCGAACAAC	AATATCTTTC	TCGATTCAC	ATTTCCGGCG	AAAATAGCAA	ATTTCTCAAT
GGCTAGACCT	GCCATAGACT	CATTGATGCC	TAAAGTTGAT	GTGTTTGATT	ATGGAGTTGT	TTTGTTACAA	TTGCTTTCTG
GAAAGAAGGC	CATGGTAACC	AAAGAAAATG	GCGAGATTGT	TCTGCTGTGC	AAGGAAATCA	AAGCCGTCTT	GGTAATTGAA
GAGAAAAGAG	AAGAGAGTCT	AAGAAAAGTG	ATGGATCCCT	ACTTGGAGAG	GTTTTATCCC	ATTGATAGTG	CTCTAAGCTC
GGCAACCTTG	GCAAGGTTGT	GCACTCTGGA	GGAGCTTCA	GAAAGGCCAA	GCATGGCAGA	AATTGTCTTT	AACCTCACAG
TTCTCACTCA	GTCATCTCCT	GAGACATTTG	AAAGATGGAC	ATCTGGGATG	GAAACAGAAA	ATTTTACTCG	ACTCATCAGC
CCTGTACACG	CTCGTTGA						

NFP-like1 Tremula-Allel:

ATGGCAATAT	CTTTGCTCCC	TTTCTTTTCC	ACACAAGCTC	TACTTCTCTT	GATCCTTTTA	TTTTCGTCCA	CCCATGTCTC
CTTACAAGCA	CCACCCGCCT	CAAACCTTTC	ATGCCTGTG	GATTCACCTA	CCACATGCTC	TACATATTTT	ACTTACCTTG
CCCGGCCACC	AAATTTCTTG	GACCTCGGAA	ACATTTCTGA	TCTATTTGGG	GTCACCTCGTA	AAGAAATAGC	AGCTGCAAGC
AACCTGGAGT	CTGAGGACAC	CCCATTATTT	CCAAATCAAC	TTTTGCTTGT	ACCTAAACCT	TGTGGTTGCA	CAGGTAACCT
ATCTTTTGCC	AATATCACTT	ACCAAATCCA	GCAAGGTGAT	AGCATCTACT	TGGTTTCGAC	TACTTCATTT	GAGAACCTCA
CCCGATGGCA	AGAGGTGGAA	GCTTTGAACC	CCAGTCTGAC	TCCAGCCCTC	TTGGATGCTG	GTGACAAGGT	TATATTTCTT
TTGTTCTGTA	AGTGCCCTTC	AAAACTCAT	TTGGAGAGCG	GAATTGCTTA	TCTCATTACT	TATGTGTGGC	AACCTAGTGA
TGATCTCACG	AAAGTTGCTG	CTAAACTTAA	TGCCTCTGAA	CGTAACATTG	TGATTGAAAA	CCACTATGTG	AACTTTACTG
CTGCAGTCTA	TCTCCCGGTA	TTGATCCCTG	TGTCCCAGTT	GCCAGTTCTC	TCTCAGCAAT	ACCCCTCTCC	TGAAAAGAAGA
GAATCCAGGA	ATCGTTGGAT	CATCATTGTT	GCTGCAAGCA	TTGCAAGCGC	TCTTTTGATC	TTCCTTTTGA	TTGCTTTTCT
GGCCCATAAA	CGTTGTTCAT	ATAAGAGAAC	TAAAGCTTTG	GATCGCACTG	GATCTTGTTT	GGAGACCTGC	GATCTCAATC

6 Anhang

AAACAAAGGA	ACTTACAAAA	CTGGAGAGTT	TTGAGGCAAA	GGTCACACCA	GATAAGCTGC	TTCCAGGGGT	TTCAGGCTAT
CTGGGCAAGC	CGATCATTTA	TGAGGTTAAA	GAGATCATGG	AGGGAACGAT	GGATCTAAAT	GAACATTATA	AGATAGGATC
AGTATATAGG	GCCAAAATCA	ATGGTCGGGT	CTTGGCAGTG	AAGAAAACCA	AGGATGATGT	CACAAAAGAA	CTAAAGATTT
TGCAGAAAAGT	CAATCATGCA	AATCTGGTTA	AATTAATGGG	GATGTATCT	GGATTTGATA	GAGAAGGAAA	TCGCTTCTTG
ATCTATGAAT	TTGCAGAAAA	TGGGTCGCTG	GAAAAGTGGT	TGAATCCCAC	CTCTGAATCT	TCCTCAAGCT	CTGCGGGTTT
CCTCACTTGG	AGTCAAAGGT	TACATGTAGC	ACTAGATGTG	GCCAATGGCC	TGCAATACAT	GCATGAACAC	ACTCAACCAA
GCATCGTTCA	CAAGGATATT	CGAACAAATGA	ATATTCTTCT	CGATTCCACA	TTTCGGGCGA	AAATAGCAAA	TTTCTCAATG
GCTAGACCTG	CCACAGACTC	ATTGATGCCT	AAAGTTGATG	TATTTGATTA	TGGAGTTGTT	TTGTTACAAT	TGCTTTCTGG
AAAGAAGGCC	ATGGTAACCA	AAGAAATTGG	CGAGATTGTT	CTGCTGTGCA	AGGAAATCAA	AGCCGTCTTG	GAAATTGAAG
AGAAAAGAGA	AGAGAGTCTA	AGAAAGTGA	TGGATCCCTG	CTTGGAGAGG	TTTTATCCCA	TTGATAGTGC	TCCGAGCTTG
GCAACCTTGG	CAAGGTTGTG	CACTCTGGAG	GAGTCTTCTG	AAAGGCCAAG	CATGGCAGAA	ATTGTCTTTA	ACCTCACAGT
TCTCACTCAG	TCATCTCTCG	AGACATTTGA	AAGATGGACA	TCTGGGATGG	AAACAGAAAA	TTTTACTCCA	CTCATCAGCC
CTGTCACAAC	TCGTTGA						

NFP-like3 Alba-Allel:

AAAGCAGAAC	TATCAAGAAC	CAAAATGAGA	CCGCATCCC	GTTTAGTCTC	TTCTCTCTTC	TTCTTTCTCT	CTTACAGTAA
TATCCTCCAC	CACTTGCAAG	CCCAGCCAAG	CACTCAAGGG	TTCACCTGCC	CAGCCAACCA	GAGTTCCTTT	CCATGTCAAA
CCTATGCCTT	CTACCGAGCC	TCAGTCTCTA	ACTTCTTGA	CCTTGCCTCA	ATCGGTGACC	TTTTCTCGGT	TAGCCGCCTT
ATGATATCAA	AACCAAGTAA	CATCTCCTCT	CCAACTCAC	CTCTCATCCC	CAATCAACCC	CTCTTTGTCC	CTTTATCATG
TTCTTGCAAC	ACCATCAATA	TTAGCACTAG	CATTTCTCT	GCAAATATCA	CATATACCAT	CAAGGAAGGC	AACACTTTCT
ACATTGTCTC	GACTAAATAC	TTCCAAAACC	TTACGACCTA	CCAGTCAGTT	GAGCTTTTCA	ACCCTACACT	TATCCCCGAA
CTACTCGACA	TAGGAGTAGA	GGTATCTTT	CCAATCTTTT	GCAAGTGTCC	TCATCAAACC	CAGTTGCAAA	ACAAGGTGAA
TTATCTGGTA	TCTTATGTGT	TTCAGCCTTC	TGATAACTTA	TCTTCAGTTG	CTTCAACATT	TGGAGTTGAA	ACACAATCTA
TTGTTGATGT	TAATGGCAAT	AACATCCAGC	CTTATGATAC	CATATTCGTT	CCAGTCTATC	AACTTCCACA	ACTGGCACAA
CCTACAGATA	GAGCATTGAA	AGTTAACAGA	ATTGGAACCT	GATGGTGATG	CTTGATAATA	TTAAAGGAAT	GGCATCTTCT
TCTGGAAATC	CTAGCTATTC	TAAGCATGAA	TGTGGAGAAT	CTTATTGCTA	TTACTCAAAC	AATCATGAAA	CATATGCTTT
CATATTTGTT	CATAGATCAA	ATTAATATG	TAATTATTAA	AATAATTGCT	AGAGACTCAA	ATGATAAATA	TGCAAGCATG
ATAATTTATA	TAATCTTTTA	TATCTTCATG	AATCTAGAAA	TTTTTGCTTG	CATTGTATTA	TTTGATTTAT	GCACCGACAC
TGATAACATT	CGAGATTATG	CCTCAATGTA	GATGCTACAT	AATTGATTTT	CATCTTTTAG	AGACTACAAG	TATAATAGGA
GCATCCATCA	AAAAAAAAAAT	CATCCTAAGA	TAATCATCTC	ATGACTATTG	AAAACAAATC	AAATTAGATG	GTTCTATTTT
TCAATCTTTT	TTACTTGCTC	CTACAGAACC	AAGAGGTGCGA	AAAGATTGAG	AAAAATCCAT	TCACAACCGC	TTATGAAGGA
TTTCTCGAAA	AGTTAAAGAA	TTAGTAATCT	ATTTTAGAAA	TCAAATGGAT	TGAGTTTAT	ACATAGGCGA	GGAAGATAAT
CAAAAAGAA	CGCTGATGGT	AGAAAAATAT	ATAAAGACTA	AGAAATATTA	TTTCAATCGT	AAAAAAGTT	GAGTTTATGT
GAACATGTAT	GACGGGTTTT	ATTCAAAATC	AAAATGAATG	ATTCCGATGA	GTTTTGTTTT	TTTAACTATA	ATCTTGTTAT
TTATCAAAAT	TAGTTGATTG	TAACTCTTTT	AAATTCGATG	AAGTATTTGT	TATTTATTTA	GACCATGTTT	ATTTCTTAAA
AGTAGTTTCT	GGAAAACCAC	TTTCTAAATT	TTTATATGTT	TGTTTGTTAT	TATAAAAGAT	GGCCAACGGA	AAACACTTTT
CAGTTAAAGA	AAAACATTTT	TCGGTCAATG	AAAAACACTT	TCCAGTCAAA	GGAAAATTTG	GCTTGGTTTT	CAGGAAAGTA
TTTTCCCTCT	TAGCTGTGTT	TGTTTTCCGA	AAAGTGATTT	TCAGGAAACT	ACTTTCCAAA	CTTTCATATG	TTTATTTGCT
ATTAGAAATG	TTAGTCAACG	GAAAATACTT	TTCAGTCAAA	AGAAAATTTG	GTTTGTTTTT	CAGGAAAGTG	TTTTTCTGAA
AAATTTAGGG	GGAAAACACT	TTCCAGAAGT	TGTGAAAAAT	TCAAAAATAT	CATTATTTGC	TGATTATATC	AAATTTGATC
CTCAAACCTT	TGATTGCTAT	ATATATTTTG	TTTTGAATAT	TTATTTTCA	ATTTCACTCT	TTAAAATTTT	ATTTTATAT
TAACCTTGGT	CCTTATTTTT	ATAATTGCTA	TTTGCTTTTT	TCTTATCATT	TTTTTATTTA	AATTTTTTAT	TTATCAAATT
TGATCCTCAT	TATTTTGATT	GTTACTTATT	TTATTTGAAA	TAATTTATGA	AATGTTGATT	ATTATATTTT	TAATTTCTTC
ATCTTTTATT	TTTTTTAATT	TTTTAGATTT	GATCTCTATT	ATTTTGATTA	TTATTTATTT	TATTTGAGAT	AATTTATGAA
ATTATATTTT	TTTTCAATTT	CATTCTCATT	CAACTTTTTA	ATTTGTAAGA	TTTGTTTCTT	ATTATTTTAA	TAAACTTGAA
AAAAATAAAA	TATTAATAAG	TTATTTTCCA	GCTTATTTTT	CATGACATAA	CTAAATACTA	AAAAATATTT	TTCAATTTAT
TTTTTATTAC	ACTACCAAAC	ATCAAAAAAT	ATTTTTTAAA	ATTTATTTTT	TGAAGATACA	CTTCTTTTGA	AGAGAAAAAT
TTCTTTTCAG	CAAATAAATT	ACACTAATTT	TAAATAATCC	ATCCATTGAA	GCTGACTGAA	AGTCCACGAA	GGTGGGATCC
AGCAGGTGGT	TGGACCCCTT	TCATTGATGG	AAGAAGAGAA	AAAGGTGACC	ATATTATCGA	CTAGTTGATA	TCACCTTTAC
CTTCTTCTTT	AAAACAAAAC	ATTGCAAGGC	AGAAAAGCAG	AACTATCAAG	AACCAAATG	AGACCCGCAT	CCCGTTTAGT
CTCTTCTCTC	TTCTTCTTTC	TCTCTTACAG	TAATATCTCT	CACCACTTGC	AAGCCGAGCC	AAGCACTCAA	GGGTTACCTT
GCCAGCCAA	CCAGAGTTCC	TTTCCATGTC	AAACCTATGC	CTTCTACCGA	GCCTCAGCTC	CTAACTTCTT	TGACCTTGCC

6 Anhang

TCAATCGGTG	ACCTTTTCTC	GGTTAGCCGC	CTTATGATAT	CAAAACCAAG	TAACATCTCC	TCTCCAACCT	CACCTCTCAT
CCCCAATCAA	CCCCTCTTTG	TCCCTTTATC	ATGTTCTTGC	AACCCCATCA	ATAGCACTAA	CATTTCTCTC	GCAAACATCA
CATATAACCAT	CGAGGCAGGC	AACACTTTCT	ACATTGTCTC	GTCTGAATAC	TTCCAAAACC	TTACGACCTA	CCAGTCTGTT
GAGCTTTTCA	ACCCTACACT	TATCCCCGAA	CTACTCGACA	TAGGAGTAGA	GGTGATCTTT	CCAATCTTTT	GCAAGTGTCC
TAATCAAACC	CAACTGCAAA	ACAAGGTGAA	TTATCTGGTA	TCTTATGTGT	TTCAGCCTTC	TGATAACTTA	TCTTCAGTTG
CTTCAACATT	TGGAGTTGAA	ACACAATCTA	TTGTTGATGT	TAATGGCAAT	AACATCCAGC	CTTATGATAC	CATATTCGTT
CCAGTCAATC	AACTTCCACA	ACTGGCACAA	CCTACAGTAG	CTGTTCTCTG	TCCTTCTGGG	GCGCCGCCCC	CTGAGAAGAC
AGAGAGGAAA	GGTGTGATTA	TAGGATTAGC	AGTTGGGCTA	GGAAATGCTG	GGCTTTTATT	GGTCTTGGTA	AGTGGGGTTT
GGTTTTATAG	AGAGGGTTTG	TTGAAGAAGA	GAAGAGATGT	TGAGAAAAGT	GAGGAGAAGC	GTAGGATGCA	GTTGAATGGG
GGAAGGAAAG	GGTTGAAGGA	TATAGAAGTG	AATTTGATGG	CAGATGTTTC	AGATTGCTTG	GATAAGTACA	GGGTCTTTAA
GATTGATGAA	CTGAAAGAAG	CTACTAATGG	GTTCGGTGAA	AATTGCTTGA	TTGAAGGATC	TGTGTTTAAA	GGGTCCATAA
ATGGAGAGAC	CTATGCCATC	AAGAAGATGA	AGTGGAAATG	ATGTGAGGAG	CTCAAGATAT	TGCAGAAGGT	AAGTTTTTTT
TTCTTTTAC	TGATTACAGA	TTTACAGTAT	ATACTCCAGC	CTTACTGTG	TGTTTTGGTT	TCCAATGAGA	TAGTAGGATC
AGGGACCCAG	TTGCATAAAA	CTTTGCTGTT	TCCATGCTTT	TACAGCTCAT	AAAATTTAAC	ACATAAACC	CAATTAAGA
CGACTTGGCA	TTTTATATTT	CACAAGCTTT	CAATGCATAC	CCGTGATCAG	AGTTCAGTA	GAGCAGAGGT	CTAGCCTTAT
CGCCGTCAATG	AAAAACCTCT	AGTCTTGACC	TGAACTCCCA	AGTAGCAACA	TAGACGATTA	AGTTCATGAA	TCTCATCTGC
TTGATTTCTG	TGGGCTGGGA	TATTTTGAGC	CATAGGAAAT	TTTTACATAA	ATCCAGATGC	GGAGGGGCCA	TTATGAGGAA
TCCAGAAAAA	CACGGGATTA	AAAATTGAGA	CATGACAAGG	ACACCAATGT	CTGACTTCCA	TTAAAATTTG	CAAGTGTCTA
ATTTTTATAA	TGGTTAGGTG	AAGTGACATG	TCTATTCCGC	AGCTTCATAA	TGAGATTAGG	ATGTTATGTC	AGATCGGCCC
ATTTCTTTGA	GGGCGTGCTA	TTGCGGAATG	TGGATTCCCTC	ATCAGATGAA	GGCAGTAGTC	AAATGCCTTC	TTTTCTCCAG
AACAAAATCA	ATGAAGCTGT	CGACTTCCCA	GTTAAAAGAA	GTCATGATGC	CATTATCAGA	ACATGGACTT	TCAAGCCATA
GCTAAATACT	GAAATGTCAA	CCTTTTGTTT	CTTGATATCC	TTGCCTTACT	AAATTCGTCA	GATAAATGAA	TGTGCCTAAC
TGCAAATATT	TGAAATTTAA	TGCTAATATA	TATAAATAAA	TGGATGGTTT	TATTATAAAA	AAATAATGGT	AAATATATAA
ATAAGTGAAT	GATTTCAATG	CCATCAACTC	CTGGAATAGC	TTAGCGTATA	TATTTCTTTA	AGCCATTTCT	TTTAGCTCCA
TGGGTTGGAC	GGTTTGGGTT	AAATATGTAG	AATAAAATGC	TTTAGCCAAA	GCAGAACTGT	GATATAATTT	GTCTAATACC
CACCATAATTA	TGTTTAAAGAG	CTTATTGACT	TTCATTTTAA	TCATCTATGA	AAATACATTT	CTGTATGGCT	GTGTGGCAAA
CTCACTGTTC	CCTGTTGAAG	GTA AACCATG	GCAACTTGGT	GAAGCTAGAG	GGCTTTTGCA	TAGACCCCGA	GGATGCAAA
TGCTATCTGG	TCTACGAGTT	CGTAGACAAT	GGCTCTCTAC	ATTCGTGGTT	GCATCGCAAC	GAGAGAGAAA	AACTAAGCTG
GAAAACAAGG	TTACGGGTTG	CAATTGATGT	TGCAAATGGT	CTCCAATACA	TCCATGAGCA	CAC TAGGCCA	AGGGTTGTGC
ACAAAGACAT	TAAAAGCAGC	AAATACCTCT	TGGACTCCAG	CATGAGAGCC	AAAATTGCCA	ACTTTGGACT	GGCAAAAACA
GGCTGCAACG	CCATAACAAT	GCACATTGTT	GGCACTCAAG	GCTACATTGC	GCCTGAATAT	TTAGCTGATG	GTGTGGGTGC
AACGAGAATG	GATGTTTTCT	CTTTTGGTGT	GGTTTGTCTT	GAGCTAATCT	CAGGAAGAGA	AGCAATTGAT	GAAGGAGGCA
AGGTTCTGTG	GGCAGAAGCT	ATTGGAATTC	TGGATGGAAA	TGTTGAAGAG	AGGAAGGTGA	AGAGATTGAC	AGCATGGATG
GACAAGGTTC	TTTTAGAGGA	GTCATGCTCA	ATGGAGAGTG	TAGTGAATAC	AATGGCTGTT	GCAATTGCTT	GCTTGCATAG
AGATCCATCA	AAGAGGCCTA	GCATGGTGGA	TATTGTCTAT	GCCTTGTGCA	AGAGCGATGA	TTTGTTTTTT	GACATCTCAG
AAGACGGATT	GGCAAACCTC	CAGGTTATGG	CAAGATAAGT	TGTGTTTTTG	GGGAGCTGGT	AATAAGATTT	AGGGAGTAAT
TAAAGTAAAG	GGTTGTATAT	TTAAGCTTAA	TAATATGATG	TAATATATAT	ATTAAGACTG	AAACATACGG	TGCCACTTTG
CACATAAACA	AATTAAGTGT	GAAATTGGC					

NFP-like3 Tremula-Allel:

AAAGCAGAAC	TATCAAGAAC	CAAAATGAGA	CCCGCATCCC	GTTTAGTCTC	TTCTCTCTTC	TTCTTTCTCT	CTTACAGTAA
TATCCTCCAC	CACTTGCAAG	CCCAGCCAAG	CACTCAAGGG	TTCACCTGCC	CAGCCAACCA	GAGTTCCTTT	CCATGTCAAA
CCTATGCCTT	CTACCGAGCC	TCAGCTCCTA	ACTTCTTTGA	CCTTGCCTCA	ATCGGTGACC	TTTTCTCGGT	TAGCCGCCTT
ATGATATCAA	AACCAAGTAA	CATCTCCTCT	CCAACTCAC	CTCTCATCCC	CAATCAACCC	CTCTTTGTCC	CTTTATCATG
TTCTTGCAAC	ACCATCAATA	TTAGCACTAG	CATTTCTCTC	GCAAATATCA	CATATAACCAT	CAAGGAAGGC	AACACTTTCT
ACATTGTCTC	GACTAAATAC	TTCCAAAACC	TTACGACCTA	CCAGTCAGTT	GAGCTTTTCA	ACCTTACACT	TATCCCCGAA
CTACTCGACA	TAGGAGTAGA	GGTGATCTTT	CCAATCTTTT	GCAAGTGTCC	TCATCAAACC	CAGTTGCAAA	ACAAGGTGAA
TTATCTGGTA	TCTTATGTGT	TTCAGCCTTC	TGATAACTTA	TCTTCAGTTG	CTTCAACATT	TGGAGTTGAA	ACACAATCTA
TTGTTGATGT	TAATGGCAAT	AACATCCAGC	CTTATGATAC	CATATTCGTT	CCAGTCTATC	AACTTCCACA	ACTGGCACAA
CCTACAGATA	GAGCATTGAA	AGTTAACAGA	ATTGGAACCT	GATGGTGATG	CTTGATAATA	TTAAAGGAAT	GTCATCTTCT
TCTAAAAATC	CTAGCTATTC	TAAGCATGAA	TGTGGAGAAT	CTTATTGCTA	TTACTCAAAC	AATCATGAAA	CATATGCTTT
CATATTTGTT	CATAGATCAA	ATTAAATATG	TAATTTATTA	AATAATTGCT	AGAGACTCAA	ATGATAAATA	TGCAAGCATG

6 Anhang

ATAATTTATA	TAATCTTTTA	TATCTTCATG	AATCTAGAAA	TTTTTGCTTG	CATTGTATTA	TTTGATTTAT	GCACCGACAC
TGATAACATT	CGAGATTATG	CCTCAATGTA	GATGCTACAT	AATTGATTTT	CATCTTTTAG	AGACTACAAG	TATAATAGGA
GCATCCATCA	AAAAAAAAAT	CATCCTAAGA	TAATCATCTC	ATGACTATTG	AAAACAAATC	AAATTAGATG	GTTCTATTTT
TCAATCTTTT	TTACTTGCTC	CTACAGAACC	AAGAGGTCGA	AAAGATTGAG	AAAAATCCAT	TCACAACCGC	TTATGAAGGA
TTTCTCGAAA	AGTTAAAGAA	TTAGTAATCT	ATTTTAGAAA	TCAAATGGAT	TGAGTTTTAT	ACATAGGCGA	GGAAGATAAT
CAAAAAGAA	CGCTGATGGT	AGAAAAATAT	ATAAAGACTA	AGAAATATTA	TTTCAATCGT	AAAAAAGTT	GAGTTTATGT
GAACATGTAT	GACGGGTTTT	ATTCAAAATC	AAAATGAATG	ATTCCGATGA	GTTTTGTTTT	TTTAACTATA	ATCTTGTTAT
TTATCAAAAT	TAGTTGATTG	TAACTCTTTT	AAATTCGATG	AAGTATTTGT	TATTTATTTA	GACCATGTTT	ATTTCTTAAA
AGTAGTTTCT	GGAAAACCAC	TTTCTAAATT	TTTATATGTT	TGTTTGTTAT	TATAAAAAGAT	GGCCAACGGA	AAACACTTTT
CAGTTAAAGA	AAAACATTTT	TCGGTCAATG	AAAAACACTT	TCCAGTCAAA	GGAAAATTTG	GCTTGTTTTT	CAGGAAAGTA
TTTTCCCTCT	TAGCTGTGTT	TGTTTTCCGA	AAAGTGATTT	TCAGGAAACT	ACTTTCCAAA	CTTTCATATG	TTTATTTGCT
ATTAGAAATG	TTAGTCAACG	GAAAATACTT	TTCAGTCAAC	AGAAAATTTG	GTTTGTTTTT	CAGGAAAAGTG	TTTTTCTGAA
AAATTTAGGG	GGAAAACACT	TTCCGGAAAT	TGTGAAAAAT	TTAAAAATAT	CATTATTTGC	TGATTATATC	AAATTTGATC
CTCAAACCTT	TGATTGCTAT	ATATATTTTG	TTTTGAATAT	TTATTTTCA	ATTTTCATCTC	TTAAAATTTT	ATTTTTATAT
TAACCTTGGT	CCTTATTTTT	ATAATTGCTA	TTTGCTTTTT	TCTTATCATT	TTTTTATTGA	AATTTTTTAT	TTATCAAATT
TGGTCCFCAT	TATTTTGATT	GTTACTTATT	TTATTTGAAA	TAATTTTATGA	AATGTTAATT	ATTATTTATT	TAATTTCTTC
ATCTTTTATT	TTTTTTTATT	TTTTAGATTT	GATCTCTATT	ATTTTAAFTA	TTATTTATTT	TATTTGAGAT	AATTTATGAA
ATTATTTTTT	TTTTCAATTT	CATTCTCATT	CAACCTTTTA	ATTTGTAAGA	TTTATTTCTT	ATTATTTTAA	TAAACTTGAA
AAAAATAAAA	TATTAATAAG	TTATTTTCCA	GCTTATTTTC	CATAACATAA	CCAAACACTA	AAAAATATTT	TTCAATTTAT
TTTTTATTAC	ACTACGTAAC	ATAAAAAAAT	ATTTTTTAAA	ATTTACTTTT	TGAAGATACA	CTTCTTTTGA	AGAGAAAAAT
TTCTTTTCAG	CAAATAAATT	ACACTAATTT	TAAATAATCC	ATCCATTGAA	GCTGACTGAA	AGTCCACGAA	GGTGGGATCC
AGCAGGTGGT	TGGACCCCTT	TCATTGATGG	AAGAAGAGAA	AAAGGTGACC	ATATTATCGA	CTAGTTGATA	TTACCTTTAC
CTTCTTCTTT	AAAACAAAAC	ATTGCAAGGC	AGAAAAGCAG	AACTATCAAG	AGCCAAAATG	AGACCCGCAT	CCCGTTTTAGT
CTCTTCTCTC	CTCTTCTTTC	TCTCTTACAGT	AATATCCTCC	ACCCTTGCA	AGCCCAGCCA	AGCACTCAAG	GGTTCACCTG
CCCAGCCAAC	CAGAGTTCCCT	TTCCATGTCA	AACCTATGCC	TTCTACCGAG	CCTCAGTCC	TAACTTCCTT	GACCTTGCCCT
CAATCGGTGA	CCTTTTCTCG	GTTAGCCGCC	TTATGATATC	AAAACCAAGT	AACATCTCCT	CTCCAACCTC	ACCTCTCATC
CCCAATCAAC	CCCTCTTTGT	CCCTTTATCA	TGTTCTTGCA	ACCCCATCAT	CAATAGCACT	AGCATTTCCCT	CTGCAAACAT
CACATATAACC	ATCGAGGCAG	GCAACACTTT	CTACATTGTC	TCGTCTGAAT	ACTTCCAAAA	CCTTACGACC	TACCAGTCTG
TTGAGCTTTT	CAACCCTACA	CTTATCCCCG	AACTACTCGA	CATAGGAGTA	GAGGTGATCT	TTCCAATATT	TTGCAAGTGT
CCTAATCAAA	CCCAACTGCA	AAACAAGGTG	AAGTATCTGG	TATCTTATGT	TTTTCAGCCT	TCTGATAACT	TATCTTCAGT
TGCTTCAACA	TTTGGAGTTG	AAACACAATC	TATTGTTGAT	GTTAATGGCA	ATAACACCCA	GCCTTATGAT	ACCATATTCG
TTCCAGTCAA	TCAACTTCCA	CAACTGGCAC	AGCCTACAGT	AGCTGTTTCT	GTTCTTCTG	GGGCGCCGCC	CCCTGAGAAG
ACAGAGAGGA	AAGGTGTGAT	TATAGGATTA	GCAGTTGGGC	TAGGAATTGC	TGGGCTTTTA	TTGGCCTGG	TAATTGGGGT
TTGGTTTTAT	AGAGAGGGTG	TGTTGAAGAA	GAGAAGAGAT	GTTGAGAAAAG	TTGAGGAGAA	GCCTAGGATG	CAGTTGAATG
GGGAAGGAA	AGGGTTGAAG	GATATAGAAG	TGAATTTGAT	GGCAGATGTT	TCAGATTGCT	TGGATAAGTA	CAGGGTCTTT
AAGATTGATG	AACTGAAAGA	AGCTACTAAT	GGGTTCCGGT	AAAATTGCTT	GATTGAAGGA	TCTGTGTTTA	AAGGGTCCAT
AAACGGAGAG	ACCTATGCCA	TCAAGAAGAT	GAAGTGGAAAT	GCCTGTGAGG	AGCTCAAGAT	ATTGCAGAAG	GTAAGTTTTT
TTTTTTCTTT	TTTCTTTCAC	TGATTACAGA	TTTACAGTAT	ATACTCCAGC	CTTTACTGTT	TGTTTTGGTT	TCCAATGAGA
TAGTAGGATC	AGGGACCCAG	TTGCATAAAA	CTTCCGCTGTT	TCCATGCCTT	TACAGCTCAT	AAAATTTAAC	GCATATAGCC
CAATTAAGA	CGACTTGCCA	TTTTATATTT	CACAAGCTTT	CAATGCATAC	CAGTGATCAG	AGTTCTAGTA	GGGCGAGGTT
CTAGTAGGGC	AGAGGTCTAG	CCTTATCGCC	GTCAAGAAA	ACCTCTAGTC	TTGACCCCTG	AACTCCCAAG	TAGCAACATA
GGCGATTAAAG	TTCATGAATC	TCATCTGCTT	GATTTCTGTG	GGCTGGGATA	TTTTGAGCCA	TAGGAAATTT	TTACATAAAT
CCAGATGCGG	AGGGGCCATT	ATGAGGAATC	CAGAAAAACA	CGGGATTAAA	AATTGAGACA	TGACAAGGAC	CCAATGTCTG
AATTCCATTA	AAATTTGCAA	GTGTCTAATT	TTTATAATGG	TTAGGTGAAG	TGACCTGTCT	ATTCCGCAGC	TTCATAATGA
GATTAGGATG	TTATGTCAGA	TCGGCCCAT	TCTTTGAGGG	CGTGCTATTG	CGGAATGTGG	CAGTAGTCAA	ATGCCATCTT
TTCTCCAGAA	CAAAATCAAT	AAAGGCTGTC	GACTTCCCAG	TTAAAAGAAAG	TCATTATGCC	ATTATCAGAA	CATGGACTTT
CAAGCCATAG	CTAAACTACTG	AAATGTCAAC	CTTTTGCTTC	TTGATACCCCT	TGCCTTACTA	AATTCGCGAG	ATAAATGAAT
GTACGTAAC	GCAAAATATT	CGAAATCAAA	TGCTAACATA	TAGAAATAAG	TGGGTGATTT	TATTTAAAAA	AAATAATGAT
AAATATATAA	ATAAGTGAAT	GATTTTATTG	CCATCAAGCT	CCTGGAATAG	CTTAGCGTAT	ATATTTTCTT	AAGCTATTTT
TTTTAGTTCC	ATGGGTTGGA	CAGTTTGGGT	TAAATATGTA	GAATAAAATG	CTTTAGCCAA	AGCAGAAGT	TGATATAAAT
TGCTAGTAC	CCACCAAATT	ATGTTTAAAGA	GCTTCATGAC	TTTCATTTTA	ATCATCTATG	AAAATACATT	TCTGTATGGC
CGTGTGGCAA	ACTCACTGTT	CTCTGTTGAA	GGTAAACCAT	GGCAACTTGG	TGAAGCTAGA	GGGCTTTTGC	ATAGACCCCG

6 Anhang

AGGATGCAAA	TTGCTATCTG	GTCTACGAGT	TCGTAGACAG	TGGCTCTCTA	CATTCGTGGT	TGCATCGCAA	CGAGAGAGAA
AAACTAAGCT	GGAAAAAAG	GTTACGCATT	GCAATTGATG	TTGCAAATGG	TCTCCAATAC	ATCCATGAGC	ACACTAGGCC
AAGGGTTGTG	CACAAAGACA	TTAAAAGCAG	CAATATCCTC	TTGGACTCGA	GCATGAGAGC	CAAAATTGCC	AACTTTGGAC
TGGCAAAAAC	AGGCTGCAAC	GCCATAACAA	TGCACATTGT	TGGCACTCAA	GGCTACATTG	CGCCTGAATA	TTTAGCTGAT
GGTGTGGTGT	CAACGAGAAT	GGATGTTTTC	TCTTTTGGTG	TGGTTTTGCT	TGAGCTAATC	TCAGGAAGAG	AAGCAATTGA
TGAAGGAGGC	AAGGTTCTGT	GGGAGAAGC	TATTGGAATT	CTGGATGGAA	ATGTTGAAGA	GAGGAAGGTG	AAGAGATTGA
CAGCATGGAT	GGACAAGGTT	CTTTTAGAGG	AGTCATGCTC	AATGGAGAGT	GTAGTGAATA	CAATGGCTGT	TGCAATTGCT
TGCTTGACATA	GAGATCCATC	AAAGAGGCCT	AGCATGGTGG	ATATTGTCTA	TGCCTTGTGC	AAGAGCGATG	ATTTGTTTTT
TGCATCTCA	GAAGACGGAT	TGTCAAACCC	TCAGGTAATG	GCAAGATAAG	TTGTGTTTTT	GGGGAGCTGG	GGATAAGATT
TAGGGAGTTA	TATATTAAG	TAAAGGTTG	TATATTTAAG	CTTAATAATA	TGATGTAATA	TATATATTA	GACTGAAACA
TACGGTGCCA	CTTTGCACAT	AAACAAATTA	AAGTGGAAAT	TGGC			

NFP-like4 Alba-Allel:

AATACAAAAC	ATTGCAAGGC	AGAACAACCA	AGCCAAAAAT	GACAGCCAAA	TCCCATCTAG	TCTTCTCTCT	CCTCTTTTTT
ATCTATTACA	GTACTATCCT	CCACCATTTC	CAAGCCCAAC	CAAGCACCCA	AGGATTCACC	TGCACAGCCA	ATCAGAGTTC
CTTTCCATGC	CAAACCTATG	CCTTCTACCG	GGCTACGGCT	CCTAACTTCC	TTGACCTTTC	CTCAATCGGT	GACCTTTTCT
CGGTTAGCCG	CCTTATGATA	TCAAAAACCA	GTAACATCTC	CTCTCCAGCC	TCTCCTCTCA	TCCCAATCA	ACCCTTGTTT
GTCCCTTTAT	CATGTTCTTG	CAACACCATG	AATGGCACTA	GCATCTCCTT	TGCAAACATC	ACATATACCA	TAAAGCCAGA
TGACACTTTC	TACCTTGTCT	CAACTGAATC	CTTCGGAAC	CTTACTACCT	ACCAGTCTGT	TGAACTTGTT	AACCTTACGC
TTATCCCCAC	ACGACTCCCA	ATAGGAGTAG	AAGTGATCTT	TCCAATATTT	TGCAAGTGTC	CTAATCAAAC	TCAATTGCAA
ACAAGGTGA	ATTATCTGGT	ATCTTATGTG	TTTTCAGCCTT	CTGATAACTT	ATCATCAGTT	GCTTCAACAT	TTGGAGTCGA
AACACAATCT	ATTGTGGATG	CTAATGGCAA	TAACATACAG	CCTTTTGATA	CCATATTCAT	ACCAGTAAAT	CAACTTCCAC
AACTGGCACA	ACCTACGGTT	TTTCCTTCTT	TGGCGCCTTC	TGGGAAGACT	CAGAGGAAAG	GTTTGATCAT	AGGATTAGCA
GTTGGACTAG	GAATTGCCGG	GCTTTTGTG	GTCTTGGTAA	GCGGGGTTTG	TTTTTATAGA	GACGGTGTAT	TGAAGAAGAG
AAGAGATTTT	GAGAGAGATG	ATCAGGAGAA	GCAGAGGATG	CAGTTCAATG	GAGGAAGGAA	AGGGTTGAAG	GATATAGAAG
TGAGTTTGAT	GGCAGATGTT	TCAGATTGCT	TGGATAAGTA	CATGGTTTTT	AAGATTGATG	AACTGAAAGA	AGTACTGAT
GGGTTCCGGT	AGAATTGCTT	GATTGAAGGA	TCGTGTTTTA	AAGGGTCCAT	AAATGGAGAG	ACCTATGCTA	TCAAGAAGAT
GAAGTGGGAT	GCCTGTGAGG	AGCTCAAGAT	ATTGCAGAAG	GTAAGATCTT	TTTAACTAAT	TACTGTATAT	ACTCCAGCCT
TCACTGTTTG	TTTGGTTTCC	AATGAAATAG	TAGGATCAGG	GACACAGTTG	CATGAACCTC	AGTTGTTTCC	ATACTTTTAC
AGTTCACAAG	GATTCAGCCT	TTATAGCACA	ATTAAAGATG	AGTTTAGAAT	TTATATTTCA	CAAGTTTGCA	ATTCATGCTA
GCGATTCAAG	CTCCAGCAGA	GCAGAGCTCT	GGCCCTTCCC	TAGCATGATA	AACTTCTGGT	CTTGACCTAA	ACTCCCTAGT
AGCAAAATAG	ATGGTGATGA	TGTCATGAT	CTCATCTGTT	TGATTTGTGT	AGCCATGGAT	ATGTTGTGCA	ATAGGAAATT
GTAGCATAAA	CCTAAACGCG	GGGGCTGTAA	TGAGAAATAT	AGAAAAATGT	GGGATTAATA	ATCGAAACAT	CCAAATAAAA
TAACGACACC	GGTGACCGGT	GTATGACTTT	CATTAAATG	TGCAACTGTC	TAATTTTATA	TTGGTTAGGT	GAAGTGACGT
TTGTATTAG	CAGGTTTAAAT	AATTGGAGTA	GATGTCTTAA	TCCATGGTCA	AGTTTTCAAT	ATGTTGCGAT	GTTTTTAAAT
ATATTTATTA	CATCTTGAT	AATATTTAAT	TTCTTAATAT	GTTTTTTATG	AAGTTTTTGA	CATAATTATA	TTTTTCGCTC
TTAGAATATC	CCTGAGGTCT	ACAAAAATAT	AATATTGATT	TAAAAAATAA	TAAAAATCCTT	ACTCTTTAA	ATCTTAATGA
TTAAGTAATT	TTAAAACCTT	CTATTTCTTA	AAATATTTTT	AGCAATTCTT	AGAGAGTTTT	TTATTACATT	CTTATACAAC
TCAAATACAG	TTTTTATAAT	GTTGTTAACT	TAAACAGCTC	CGTACTGTTA	ATTTCCCTAG	AGCAAGAGCT	TGGATATTGG
ATTGCCCAT	CTCAAGGCCA	TGAAACAATT	TCCTTGCCAA	TAATAAAAAA	AGAGGTTGAT	TAGTTGAATG	CAACAATCCT
GACCATGTTC	AATCTTGAAA	TGACAGGAA	GGATGATAAG	CATTAGGTGA	AGTTTTATTT	AGAGAGATCT	AGACTGAAAT
GCTTAATATA	GCGCAGTGAT	ATAATTGCCA	AGTATCTACC	AAATTAAGT	TCATTTATTT	TTCGTAATTC	ATGGGATCTT
TTCTTTCCT	GTGAAAATAC	ATTTTCATAT	TGCTACGTGA	GAAAACTCA	CTGTTTCTT	TGTTTGAAGG	TAAACCATGG
CAACTTGGTG	AAGCTAGAAG	GCTTTTGCAT	AGACCCTGCG	GATGCAAATT	GCTATCTGGT	CTACGAGTAC	GTCGACAATG
GCTCTCTGCA	TTCGTGGTTA	CATGGTAACG	AGAAAGAAAA	ACTAAGCTGG	AAAGCAAGGT	TACGCATTGC	AATTGACGTT
GCAAAATGGTC	TCCAATACAT	CCATGAGCAC	ACCAGGCCAA	GGTTGTGACA	CAAAGACATT	AGAAGCAGCA	ACATTTCTCT
AGACTCGAGC	ATGAGAGCCA	AGATTGCCAA	CTTCGGACTA	GCAAAATCAG	GCTACAATGC	CATAACAATG	CACATTGTGC
GCACCCAAAG	CTACATTGCA	CCTGAATATT	TAGCTGACGG	TGTGGTGTCA	ACAAGAATGG	ATGTTTTCTC	ATTTGGTGTG
GTTTTGCTTG	AGCTAATCTC	CGGCAAAAGAA	GCAATTGACG	AAGAAGGCAA	GGCTTTGTGG	GCAGAAGCTA	GTGGAATTTT
GGAGGAAAT	GTTGAAGAGA	GGAAGGTGAA	GAGATTGACA	CAATGGATGG	ATAAGGTTCT	TTTAGAGCAG	TCATGCTTGA
TGGAGAGTGT	AATGAATGCA	ATGGTTGTTG	CAATTGCTTG	CTTGCATAGA	GATCCATCAA	AGAGGCCAG	CATGGTGGAT

6 Anhang

ATTGTTTTATG	CCTTGTGTA	GACCGATGAT	CTGTTTTTTG	ACATCTCAGA	AGACGTATTG	TCAGACCCTC	AGGTAATGGC
AAGATAAGTT	ATTATCATTT	TTAGGATCTG	GAGATAAGAT	TTTGGTAGTT	AAGGATTTTA	TATGTATATA	TATGAGCTTT
GATAATATGA	TGTAACATAT	ATACGTATGT	TTACAAAGTT	AGCTGTATAA	AATCTTCTGG	AACCGTATAA	TGCCATTTTG
TACCTGAACA	AAAATGGATC	TTGCTGTGTT	TAAAAGGCGT	TCTGGATTGT	GAACCCATA	ATGCTATCCT	GTTCTTGAAC
AAATTGAAGT	TGGCGGTGCT	GTTTT					

NFP-like4 Tremula-Allel:

AACACAAAAC	ATTGCAAGGC	AGAAAGGCAG	AACAACCAAG	CAAAAAATGA	CAGCCAAATC	CCATCTGGTC	TTCTCTCTCC
TCTTTTTTAT	CTATTACAGT	ACCATCCTCC	ACCATTTGCA	AGCCCAACCA	AGCACCCAAG	GATTCACCTG	CACAGCCAAT
CAGAGTTCCCT	TTCCATGCCA	AACCTACGCC	TTCTACCGGG	CTACGGCTCC	TAACCTCCTT	GACCTTTCCT	CAATCGGTGA
CCTTTTCTCG	GTTAGCCGCC	TTATGATATC	AAAACCAAGT	AACATCTCCT	CTCCAGCCTC	CCCTCTCATA	CCCAATCAAC
CCTTGTTTGT	CCCTTTATCA	TGTTCTTGCA	ACACCATGAA	TGGCACTAGC	ATCTCCTTTG	CAAACATCAC	ATATACCATA
AAGCCAAATA	ACACTTCTTA	CCTTGTCTCA	ACTGAATACT	TCGGAAACCT	TACTACCTAC	CAGTCTGTTG	AACTTGTTAA
CCCTACGCTT	ATCCCCACAC	TACTCCCAAT	AGGAGTAGAA	GTGATCTTTC	CAATATTTTG	CAAGTGTCTT	AATCAAACCTC
AATTGCAAAA	CAAGGTGAAT	TATCTGGTAT	CTTATGTGTT	TCAGCCTTCT	GATAACTTAT	CATCAGTTGC	TTCAACATTT
GGAGTCGAAA	CACAATCTAT	TGTGGATGCT	AATGAAATA	ACATACAGCC	TTTTGATACC	ATATTCATAC	CAGTAAATCA
ACTTCCACAA	CTGGCACAAC	CTACGGTTTT	TCCTTCTTTG	GCGCCTTCTG	GGAAGACTGA	TCAGAGGAAA	GGTTTGATCA
TAGGATTAGC	AGTTGGACTA	GGAATTGCGG	GGCTTTTGTT	GGTCTGGGTA	AGCGGGGTTG	GTTTTTATAG	AGACGGGTGA
TTGAAGAAGA	GAAGAGATTT	TGAGAGAGAC	GATCAGGAGA	AGCAGAGGAT	GCAGTTCAAT	GGAGGAAGGA	AAGGGTTGAA
GGATATAGAA	GTGAGTTTGA	TGGCAGATGT	TTCAGATTGC	TTGGATAAGT	ACAGGGTCTT	TAAGATTGAT	GAAGTAAAG
AAGCTACTGA	TGGGTTCCGT	GAGAATTGCT	TGATTGAAGG	ATCTGTGTTT	AAAGGTCCA	TAAATGGAGA	GACCTATGCC
ATCAAGAAGA	TGAAGTGGGA	TGCCTGTGAG	GAGCTCAAGA	TATTGCAGAA	GGTAAGATCT	TTTTCACTAA	TTACTGTATA
TACTCCAGCC	TTCCTGTTTT	GTTTTGGTTT	CAATGAAATA	GTAGGATCAG	GGACACAGTT	GCATGAACCT	CAGTTGTTTT
CATACTCTTA	CAGTTCACAA	GGATTCAGCC	TTTAATTATA	GCACAATTAA	AGATGAGTTA	GAATTTATAT	TTCAACAGTT
TGCAATCCAT	TTTAGCGATT	CAAGCTCCAG	CAGAGCAGAG	TTCTGGCCCT	TCCCTAGCAT	GATAAACTTC	TGGTCTTGAC
CTAAACTCCC	AAGTAGCAAA	ATAGATGGTG	ATGATGTCCA	TGATCTCATC	TGTTTGATTT	GTGTAGCCAT	GGATATGCTG
TGCAATAGGA	AATTGTAGCA	TAAACCTAAA	TGCAGGGACT	GTAAATGAGAA	ATATAGAAAA	ATGTGGGATT	AAAAATCGAA
ACATCCAAAT	AAAATAACGA	CAACGGTGAC	CGGTGTATGA	CTTTCATTAA	ATTGTGCAAC	TGTCTAATTT	TATATTGGTT
AGGTGAAGTG	ACGTTTGTAT	TCAGCAGGTT	TAAGGTTGAA	AATGGGGTGG	CATTTCAATT	TGTTTTCAGC	TGTTTAATAA
TTGGAGTAGA	TGCCTTAATC	CATGGTCAAG	TTTTCAATAT	GTTTCGATGT	TTTTAATTAT	ATTTATTACA	TCTTGTATAA
TATTTAATTT	CTTAATATGT	TTTTTATGAA	GTTTTTGACA	TAATTATATT	TTTCGCTCTC	ATAATATCCC	TGAGGCTCTAC
AAAAATATAA	TATTGATTTA	AAAAATAATA	AAATCCTTAT	TCTTTAAAAT	CTTAATGATT	AAGTAATTTT	AAAACCTTCT
ATTTCTTAAA	ATATTTTATG	CAATCTTAG	AGAGTTTTTT	ATTACATTCT	TATACAACCT	AAATACAGTT	TTTATAATGT
TGTTAACTTA	AACAGTCCG	TACTGTAAAT	TTCCCAGAG	CAAGAGCTTG	GATATTGGAT	TGGCCCCATC	TCAAGGCCAT
GAAACAATTT	CCTTGCCAAT	AATAAAAAAA	GAGGTTGATT	AGTTGAATGC	AACAATCCTG	ACCATGTTCA	ATCTTGAAT
GACGAGGAAG	GATGATAAGC	ATTAGTGAA	GTTTTATTTCT	GAGAGATGCT	TAGTATAGCG	CAGTATGTA	ATTGCCAAGT
ATCTACCAAA	TTAAAGTTTA	TTTATTTTTG	TAATTCATGG	GATCTTTTCT	CTTCCGTGTA	AAATACATTT	TCATATTGCT
AAGTGAGAAA	AACTCACTGT	TTCTTTGTT	TGAAGGTAAA	CCATGGCAAC	TTGGTGAAGC	TAGAAGGCTT	TTGCATAGAC
CCTGCGGATG	CAAATTGCTA	TCTGGTCTAC	GAGTACGTCG	ACAATGGCTC	TCTGCATTCT	TGGTTACATG	GTAACGAGAA
AGAAAACTA	AGCTGGAAAA	CAAGTTACG	CATTGCAATT	GACGTTGCAA	ATGGTCTCCA	ATACATCCAT	GAGCACACCA
GGCCAAGGGT	TGTACACAAA	GACATTAGAA	GCAGCAACAT	TCTCTTAGAC	TCGAACATGA	GAGCCAAGAT	TGCCAACTTC
GGACTAGCAA	AATCAGGCTA	CAATGCCATA	ACAATGCACA	TTGTCCGGCAC	CCAAGGCTAC	ATTGCACCTG	AATATTTAGC
TGACGGTGTG	GTGTCAACAA	GAATGGATGT	TTTCTCATTT	GGTGTGGTTT	TGCTTGAGCT	AATCTCAGGC	AAAGAAGCAA
TTGACGAAGA	AGGCAAGGCT	TTGTGGGCAG	AAGCTAGTGG	AATTTTGGAG	GGAAATGTTG	AAGAGAGGAA	GGTGAAGCGA
TTGACACCAT	GGATGGATAA	GGTCTTTTTA	GAGCAGTCAA	GCTTAATGGA	GAGTGTAAATG	AATGCAATGG	TTGTTGCAAT
TGCTTGCTTG	CATAGAGATC	CATCAAAGAG	GCCTAGCATG	GTGGATATTG	TTTATGCCTT	GTGTAAGACC	GATGATCTGT
TTTTTGACAT	CTCAGAAGAC	GTATTGTCAG	ACCCTCAGGT	AATGGCAAGA	TAAGTTATTA	TCATTTTTAG	GATCTGGAGA
TAAGATTTTG	GTAGTTTAGG	ATTTTATATG	TATATATATG	ACCTTTGATA	ATATGTTGTA	ACATATATAC	GTATGTTTAC
AAAGTTAGCT	GTATAAAATC	TTCTGGAACC	GTATAATGCC	ATTTTGTACC	TGAACAAAAA	TGGATCTTGC	TGTGTTTTAAA
AGGCGTTCTG	GATTTGGAAC	CCTATAATGC	TACCTTGTTT	TTGAACAAAT	TGAAGTTGGC	GGTGTGTTT	TTCTTGTC

6.1.2 Transkriptsequenzen

NFP-like1 Alba-Allel

ATGGCAATAT	CTTTGCTCCC	CTTCTTTTCC	ACACAAGCTC	TTCTTCTCTT	GATCCTTTTA	TTTTCTCCCA	CCTATGTCAC
CTCACAAGCA	CCACCTGCCT	CAAACCTTTT	ATGTCCTGTT	GATTCACCTA	CCACATGCTC	TACATATTTT	ACTTACCTTG
CCCGGCCACC	AAATTTCTTG	GACCTCGGAA	ACATTTCTGA	TCTATTTGGG	GTCACCTCGTA	AAGAAATAGC	AGCTGCAAGC
AACCTGGAGT	CTGTGGACAC	CCCATTATTT	CCAAATCAAC	TTTTGCTTGT	ACCTAAACCT	TGTGGTTGCA	CCGGTAACCT
ATCTTTTGCC	AATATCACTT	ACCAAATCCA	GCAAGGTGAT	AGCATCTACT	TGGTTTCGAC	TACTTCATTT	GAGAACCTCA
CCCGTTGGCA	AGAGGTGGAA	GCTTTGAACC	CCAGTCTGAC	TCCAACCTC	TTGCATGCTG	GTGACAAGGT	TATATTTCTT
TTGTCCTGTA	AGTGCCCTTC	AAAAACTCAT	TTGGAAAGAG	GAATTGCTTA	TCTCATTACT	TATGCGTGGC	AACCTAGTGA
TGATCTCACT	AAAGTTGCTG	CTAAACTTAA	TGTCTCTGAA	CGTAGCATTG	TGATTGAGAA	CAACTGTGTG	AACTTTACTG
CTGCAGTCTA	TCTCCCGGTA	TTCATCCCTG	TGTCCCAGTT	GCCAGTTCTC	TCTCAGCAAT	ACCCCTCTCC	TGAAAGAAGA
GAATCCAGGA	ATCGTTGGAT	CATCATTGTT	GCTGCAAGCA	TTGCAAGCGC	TCTTTTGATC	TTCCTTTTGA	TTGCTTTTCT
GGCCCATAAA	CGTTGTTCAT	ATAAGAGAAC	TAAAGCTTTG	GATCGCACTG	GATCTTGTTT	GGAGACCAGC	GATCTCAATC
AAACAAAGGA	ACTTACAAAA	CTGGAGAGTT	TTGAGGCAAA	GATGACACCG	GATAAGCTGC	TTCCAGGGGT	TTCAGGCTAT
CTGGGCAAGC	CGATCATTTA	TGAGGTTAAA	GAGATCATGG	AGGGAACGAT	GGATCTAAAT	GAACATTATA	AGATAGGAGG
ATCAGTATAT	AGGGCCAAAA	TCAATGGCAG	GGTCTTGGCA	GTGAAGAAAA	CCAAGGATGA	TGTCACAGAA	GAACATAAGA
TTTTGCAGAA	AGTCAGTCAT	GCAAGTCTGG	TTAAACTAAT	GGGGATGTCA	TCTGGATTTG	ACAGAGAAGG	AAATCGCTTC
TTGGTCTATG	AATATGCAGA	AAATAGGTCG	CTAGAAAAGT	GGTTGCATCC	CATTTCTGAA	TCTTCCTCAA	GCTCTGCGGG
TTTCTCACT	TGGAGTCAAA	GGTTACATGT	AGCACTAGAT	GTGGCCAATG	GCCTGCAATA	CATGCATGAA	CACACTCAAC
CAAGCATCGT	TCACAAGGAT	ATTCGAACAA	CTAATATTCT	TCTCGATTCC	ACATTTCCGG	CGAAAATAGC	AAATTTCTCA
ATGGCTAGAC	CTGCCATAGA	CTCATTGATG	CCTAAAGTTG	ATGTGTTTGA	TTATGGAGTT	GTTTTGTTAC	AATGCTTTC
TGAAAGAAG	GCCATGGTAA	CCAAAGAAAA	TGGCGAGATT	GTTCTGCTGT	GCAAGGAAAT	CAAAGCCGTC	TTGGTAATTG
AAGAGAAAA	AGAAGAGAGT	CTAAGAAAAGT	GGATGGATCC	CTACTTGGAG	AGGTTTTATC	CCATTGATAG	TGCTCTAAGC
TCGGCAACCT	TGGCAAGGTT	GTGCACTCTG	GAGGAGTCTT	CAGAAAGGCC	AAGCATGGCA	GAAATTGTCT	TTAACCTCAC
AGTTCTCACT	CAGTCATCTC	CTGAGACATT	TGAAAGATGG	ACATCTGGGA	TGAAACAGAA	AAATTTTACT	CGACTCATCA
GCCCTGTCAC	AGCTCGTTGA						

NFP-like1 Tremula Allel

ATGGCAATAT	CTTTGCTCCC	TTTCTTTTCC	ACACAAGCTC	TACTTCTCTT	GATCCTTTTA	TTTTCGTCCA	CCCATGTCCT
CTTACAAGCA	CCACCCGCCT	CAAACCTTTT	ATGTCCTGTT	GATTCACCTA	CCACATGCTC	TACATATTTT	ACTTACCTTG
CCCGGCCACC	AAATTTCTTG	GACCTCGGAA	ACATTTCTGA	TCTATTTGGG	GTCACCTCGTA	AAGAAATAGC	AGCTGCAAGC
AACCTGGAGT	CTGAGGACAC	CCCATTATTT	CCAAATCAAC	TTTTGCTTGT	ACCTAAACCT	TGTGGTTGCA	CAGGTAACCT
ATCTTTTGCC	AATATCACTT	ACCAAATCCA	GCAAGGTGAT	AGCATCTACT	TGGTTTCGAC	TACTTCATTT	GAGAACCTCA
CCCGATGGCA	AGAGGTGGAA	GCTTTGAACC	CCAGTCTGAC	TCCAGCCCTC	TTGGATGCTG	GTGACAAGGT	TATATTTCTT
TTGTTCTGTA	AGTGCCCTTC	AAAAACTCAT	TTGGAGAGCG	GAATTGCTTA	TCTCATTACT	TATGTGTGGC	AACCTAGTGA
TGATCTCACG	AAAGTTGCTG	CTAAACTTAA	TGCTCTGAA	CGTAACATG	TGATTGAAAA	CCACTATGTG	AACTTTACTG
CTGCAGTCTA	TCTCCCGGTA	TTGATCCCTG	TGTCCCAGTT	GCCAGTTCTC	TCTCAGCAAT	ACCCCTCTCC	TGAAAGAAGA
GAATCCAGGA	ATCGTTGGAT	CATCATTGTT	GCTGCAAGCA	TTGCAAGCGC	TCTTTTGATC	TTCCTTTTGA	TTGCTTTTCT
GGCCCATAAA	CGTTGTTCAT	ATAAGAGAAC	TAAAGCTTTG	GATCGCACTG	GATCTTGTTT	GGAGACCCTG	GATCTCAATC
AAACAAAGGA	ACTTACAAAA	CTGGAGAGTT	TTGAGGCAAA	GGTCACACCA	GATAAGCTGC	TTCCAGGGGT	TTCAGGCTAT
CTGGGCAAGC	CGATCATTTA	TGAGGTTAAA	GAGATCATGG	AGGGAACGAT	GGATCTAAAT	GAACATTATA	AGATAGGATC
AGTATATAGG	GCCAAAATCA	ATGGTCGGGT	CTTGGCAGTG	AAGAAAACCA	AGGATGATGT	CACAAAAGAA	CTAAAGATTT
TGCAGAAAAGT	CAATCATGCA	AATCTGGTTA	AATTAATGGG	GATGTATCTT	GGATTTGATA	GAGAAGGAAA	TCGCTTCTTG
ATCTATGAAT	TTGCAGAAAA	TGGGTCGCTG	GAAAAGTGGT	TGAATCCAC	CTCTGAATCT	TCCTCAAGCT	CTGCGGGTTT
CCTCACTTGG	AGTCAAAGGT	TACATGTAGC	ACTAGATGTG	GCCAATGGCC	TGCAATACAT	GCATGAACAC	ACTCAACCAA
GCATCGTTCA	CAAGGATATT	CGAACAAATGA	ATATTCTTCT	CGATTCCACA	TTTCGGGCGA	AAATAGCAAA	TTTCTCAATG
GCTAGACCTG	CCACAGACTC	ATTGATGCCT	AAAGTTGATG	TATTTGATTA	TGGAGTTGTT	TTGTTACAAT	TGCTTTCTGG
AAAGAAGGCC	ATGGTAACCA	AAGAAATTGG	CGAGATTGTT	CTGCTGTGCA	AGGAAATCAA	AGCCGTCTTG	GAAATTGAAG
AGAAAAGAGA	AGAGAGTCTA	AGAAAGTGGA	TGGATCCCTG	CTTGGAGAGG	TTTTATCCCA	TTGATAGTGC	TCCGAGCTTG
GCAACCTTGG	CAAGGTTGTG	CACTCTGGAG	GAGTCTTCAG	AAAGGCCAAG	CATGGCAGAA	ATTGTCTTTA	ACCTCACAGT

6 Anhang

TCTCACTCAG TCATCTCCTG AGACATTTGA AAGATGGACA TCTGGGATGG AAACAGAAAA TTTTACTCCA CTCATCAGCC
 CTGTCACAAC TCGTTGA

NFP-like3 Transkriptvariante 1 Alba-Allel

AAAGCAGAAC TATCAAGAAC CAAAATGAGA CCCGCATCCC GTTAGTCTC TTCTCTCTTC TTCTTTCTCT CTTACAGTAA
 TATCCTCCAC CACTTGCAAG CCCAGCCAAG CACTCAAGGG TTCACCTGCC CAGCCAACCA GAGTTCCTTT CCATGTCAAA
 CCTATGCCTT CTACCGAGCC TCAGCTCCTA ACTTCCTTGA CTTGCCTCA ATCGGTGACC TTTTCTCGGT TAGCCGCCTT
 ATGATATCAA AACCAAGTAA CATCTCCTCT CCAACCTCAC CTCTCATCCC CAATCAACCC CTCTTTGTCC CTTTATCATG
 TTCTTGCAAC CCCATCAATA GCACTAACAT TTCCTCTGCA AACATCACAT ATACCATCGA GGCAGGCAAC ACTTTCTACA
 TTGTCTCGTC TGAATACTTC CAAAACCTTA CGACCTACCA GTCTGTTGAG CTTTTCAACC CTACACTTAT CCCCGAACTA
 CTCGACATAG GAGTAGAGGT GATCTTTCCA ATCTTTTGCA AGTGTCTAA TCAAACCCAA CTGCAAAACA AGGTGAATTA
 TCTGGTATCT TATGTGTTTC AGCCTTCTGA TAACTTATCT TCAGTTGCTT CAACATTTGG AGTTGAAACA CAATCTATTG
 TTGATGTAA TGGCAATAAC ATCCAGCCTT ATGATACCAT ATTCGTTCCA GTCAATCAAC TTCCACAACCT GGCACAACCT
 ACAGTAGCTG TTCCTGTTCC TTCTGGGGCG CCGCCCCCTG AGAAGACAGA GAGGAAAGGT GTGATTATAG GATTAGCAGT
 TGGGCTAGGA ATTGCTGGGC TTTTATTGGT CTTGGTAAGT GGGGTTTGGT TTTATAGAGA GGGTTTGTG AAGAAGAGAA
 GAGATGTGA GAAAGTTGAG GAGAAGCGTA GGATGCAGTT GAATGGGGGA AGGAAAGGGT TGAAGGATAT AGAAGTGAAT
 TTGATGGCAG ATGTTTCAGA TTGCTTGAT AAGTACAGGG TCTTTAAGAT TGATGAACTG AAAGAAGCTA CTAATGGGTT
 CGGTGAAAAT TGCTTGATTG AAGGATCTGT GTTTAAAGGG TCCATAAATG GAGAGACCTA TGCCATCAAG AAGATGAAGT
 GGAATGCATG TGAGGAGCTC AAGATATTGC AGAAGGTAAA CCATGGCAAC TTGGTGAAGC TAGAGGGCTT TTGCATAGAC
 CCCGAGGATG CAAATTGCTA TCTGGTCTAC GAGTTCGTAG ACAATGGCTC TCTACATTCG TGGTGTCATC GCAACGAGAG
 AGAAAACTA AGCTGAAAA CAAGGTTACG GGTGCAATT GATGTTGCAA ATGGTCTCCA ATACATCCAT GAGCACACTA
 GGCCAAGGGT TGTGCACAAA GACATTAATA GCAGCAATAT CCTCTTGAC TCCAGCATGA GAGCCAAAAT TGCCAACCTT
 GGACTGGCAA AAACAGGCTG CAACGCCATA ACAATGCACA TTGTTGGCAC TCAAGGCTAC ATTGCGCCTG AATATTTAGC
 TGATGGTGTG GTGTCAACGA GAATGGATGT TTTCTTTTTT GGTGTGGTTT TGCTTGAGCT AATCTCAGGA AGAGAAGCAA
 TTGATGAAGG AGGCAAGGTT CTGTGGGCAG AAGCTATTGG AATTCTGGAT GGAAATGTTG AAGAGAGGAA GGTGAAGAGA
 TTGACAGCAT GGATGGACAA GGTTCTTTTA GAGGAGTCAT GCTCAATGGA GAGGTAGTG AATACAATGG CTGTTGCAAT
 TGCTTGCTTG CATAGAGATC CATCAAAGAG GCCTAGCATG GTGGATATTG TCTATGCCTT GTGCAAGAGC GATGATTTGT
 TTTTGTGAT CTCAGAAGAC GGATTGGCAA ACCCTCAGGT TATGGCAAGA TAAGTTGTGT TTTTGGGGAG CTGGTAATAA
 GATTTAGGGA GTAATTAAG TAAAGGTTG TATATTTAAG CTTAATAATA TGATGTAATA TATATATTA GACTGAAACA
 TACGGTGCCA CTTTGACAT AAACAAATTA AAGTGGAAT TGCC

NFP-like3 Transkriptvariante 2 Alba-Allel

CTCTCTTACA GTAATATCCT CCACCACTTG CAAGCCCAGC CAAGCACTCA AGGGTTCACC TGCCAGCCA ACCAGAGTTC
 CTTTCCATGT CAAACCTATG CCTTCTACCG AGCCTCAGCT CTAACCTCC TTGACCTGC CTCAATCGGT GACCTTTTCT
 CGGTTAGCCG CTTTATGATA TCAAAACCAA GTAACATCTC CTCTCCAACC TCACCTCTCA TCCCAATCA ACCCTCTTT
 GTCCCTTAT CATGTTCTTG CAACCCATC AATAGACTA ACATTTCTC TGCAACATC ACATATACCA TCGAGGCAGG
 CAACACTTTC TACATTGTCT CGTCTGAATA CTTCCAAAAC CTTACGACCT ACCAGTCTGT TGAGCTTTT AACCTACAC
 TTATCCCCGA ACTACTCGAC ATAGGAGTAG AGGTGATCTT TCCAATCTTT TGCAAGTGT CTAATCAAAC CCAACTGCAA
 AACAAAGTGA ATTATCTGGT ATCTTATGTG TTTAGCCTT CTGATAACTT ATCTTCAGTT GCTTCAACAT TTGGAGTTGA
 AACACAATCT ATTGTTGATG TTAATGGCAA TAACATCCAG CTTATGATA CCATATTCGT TCCAGTCAAT CAACTCCAC
 AACTGGCACA ACCTACAGTA GCTGTCTCTG TTCCTTCTGG GCGCCGCC CCGTGAAGA CAGAGAGGAA AGGTGTGATT
 ATAGGATTAG CAGTTGGGCT AGGAATTGCT GGGCTTTTAT TGGTCTTGGT AAGTGGGGTT TGGTTTTATA GAGAGGGTTT
 GTTGAAGAAG AGAAGAGATG TTGAGAAAGT TGAGGAGAAG CGTAGGATGC AGTTGAATGG GGAAGGAAA GGGTTGAAGG
 ATATAGAAGT GAATTTGATG GCAGATGTTT CAGATTGCTT GGATAAGTAC AGGGTCTTTA AGATTGATGA ACTGAAAGAA
 GCTACTAATG GGTTCCGGTGA AAATGCTTG ATTGAAGGAT CTGTGTTTAA AGGGTCCATA AATGGAGAGA CCTATGCCAT
 CAAGAAGATG AAGTGGAAATG CATGTGAGGA GCTCAAGATA TTGCAGAAGG TAAACCATGG CAACTGGTG AAGCTAGAGG
 GCTTTTGCAT AGACCCCGAG GATGCAAAT GCTATCTGGT CTACGAGTTC GTAGACAATG GCTCTCTACA TTCGTGGTTG
 CATCGCAACG AGAGAGAAAA ACTAAGCTGG AAAACAAGGT TACGGTTGC AATTGATGTT GCAAAATGGT TCCAATACAT
 CCATGAGCAC ACTAGGCCAA GGGTTGTGCA CAAAGACATT AAAAGCAGCA ATATCCTCTT GGACTCCAGC ATGAGAGCCA
 AAATTGCCAA CTTTGGACTG GCAAAAACAG GCTGCAACGC CATAACAATG CACATTTGTT GCACTCAAGG CTACATTGCG
 CCTGAATATT TAGCTGATGG TGTGGTGTCA ACGAGAATGG ATGTTTTCTC TTTTGGTGTG GTTTTGTCTG AGCTAATCTC

6 Anhang

AGGAAGAGAA	GCAATTGATG	AAGGAGGCAA	GGTCTGTGG	GCAGAAGCTA	TTGGAATTCT	GGATGGAAAT	GTTGAAGAGA
GGAAGGTGAA	GAGATTGACA	GCATGGATGG	ACAAGGTTCT	TTTAGAGGAG	TCATGCTCAA	TGGAGAGTGT	AGTGAATACA
ATGGCTGTTG	CAATTGCTTG	CTTGCATAGA	GATCCATCAA	AGAGGCCTAG	CATGGTGGAT	ATTGTCTATG	CCTTGTGCAA
GAGCGATGAT	TTGTTTTTTG	ACATCTCAGA	AGACGGATTG	GCAAACCTC	AGGTTATGGC	AAGATAAGTT	GTGTTTTTGG
GGAGCTGGTA	ATAAGATTTA	GGGAGTAATT	AAAGTAAAGG	GTTGTATATT	TAAGCTTAAT	AATATGATGT	AATATATATA
TTAAGACTGA	AACATACGGT	GCCACTTTGC	ACATAAACAA	ATTAAAGTGG	AAATTGGC		

NFP-like3 Transkriptvariante 1 Tremula-Allel

AAAGCAGAAC	TATCAAGAAC	CAAAATGAGA	CCCGCATCCC	GTTTAGTCTC	TTCTCTCTTC	TTCTTTCTCT	CTTACAGTAA
TATCCTCCAC	CACTTGCAAG	CCCAGCCAAG	CACTCAAGGG	TTCACCTGCC	CAGCCAACCA	GAGTTCCTTT	CCATGTCAAA
CCTATGCCTT	CTACCGAGCC	TCAGCTCCTA	ACTTCCTTGA	CCTTGCCTCA	ATCGGTGACC	TTTTCTCGGT	TAGCCGCCTT
ATGATATCAA	AACCAAGTAA	CATCTCCTCT	CCAACCTCAC	CTCTCATCCC	CAATCAACCC	CTCTTTGTCC	CTTTATCATG
TTCTTGCAAC	CCCATCATCA	ATAGCACTAG	CATTTCCTCT	GCAAACATCA	CATATACCAT	CGAGGCAGGC	AACACTTTCT
ACATTGTCTC	GTCTGAATAC	TTCCAAAACC	TTACGACCTA	CCAGTCTGTT	GAGCTTTTCA	ACCCTACACT	TATCCCCGAA
CTACTCGACA	TAGGAGTAGA	GGTGATCTTT	CCAATATTTT	GCAAGTGTC	TAATCAAACC	CAACTGCAAA	ACAAGGTGAA
GTATCTGGTA	TCTTATGTTT	TTCAGCCTTC	TGATAACTTA	TCTTCAGTTG	CTTCAACATT	TGGAGTTGAA	ACACAATCTA
TTGTTGATGT	TAATGGCAAT	AACACCCAGC	CTTATGATAC	CATATTCGTT	CCAGTCAATC	AACTTCCACA	ACTGGCACAG
CCTACAGTAG	CTGTTCTGTG	TCCTTCTGGG	GCGCCGCCCC	CTGAGAAGAC	AGAGAGGAAA	GGTGTGATTA	TAGGATTAGC
AGTTGGGCTA	GGAATTGCTG	GGCTTTTATT	GGCCTTGGTA	ATTGGGGTTT	GGTTTTATAG	AGAGGGTGTG	TTGAAGAAGA
GAAGAGATGT	TGAGAAAGTT	GAGGAGAAGC	GTAGGATGCA	GTTGAATGGG	GGAAGGAAAG	GGTTGAAGGA	TATAGAAGTG
AATTTGATGG	CAGATGTTTC	AGATTGCTTG	GATAAGTACA	GGGTCTTTAA	GATTGATGAA	CTGAAAGAAG	CTACTAATGG
GTTCGGTGAA	AATTGCTTGA	TTGAAGGATC	TGTGTTTAAA	GGGTCCATAA	ACGGAGAGAC	CTATGCCATC	AAGAAGATGA
AGTGGAATGC	CTGTGAGGAG	CTCAAGATAT	TGCAGAAGGT	AAACCATGGC	AACTTGGTGA	AGCTAGAGGG	CTTTTGCATA
GACCCCGAGG	ATGCAAATTG	CTATCTGGTC	TACGAGTTCG	TAGACAGTGG	CTCTCTACAT	TCGTGGTTGC	ATCGCAACGA
GAGAGAAAAA	CTAAGCTGGA	AAACAAGGTT	ACGCATTGCA	ATTGATGTTG	CAAATGGTCT	CCAATACATC	CATGAGCACA
CTAGGCCAAG	GGTTGTGCAC	AAAGACATTA	AAAGCAGCAA	TATCCTCTTG	GACTCGAGCA	TGAGAGCCAA	AATTGCCAAC
TTTGGACTGG	CAAAAACAGG	CTGCAACGCC	ATAACAATGC	ACATTGTTGG	CACTCAAGGC	TACATTGCGC	CTGAATATTT
AGCTGATGGT	GTGGTGTCAA	CGAGAATGGA	TGTTTTCTCT	TTTGGTGTGG	TTTTGTCTGA	GCTAATCTCA	GGAAGAGAAG
CAATTGATGA	AGGAGGCAAG	GTTCTGTGGG	CAGAAGCTAT	TGGAATTCTG	GATGGAAATG	TTGAAGAGAG	GAAGGTGAAG
AGATTGACAG	CATGGATGGA	CAAGTTCTT	TTAGAGGAGT	CATGCTCAAT	GGAGAGTGTA	GTGAATACAA	TGGCTGTTGC
AATTGCTTGC	TTGCATAGAG	ATCCATCAAA	GAGGCCTAGC	ATGGTGGATA	TTGTCTATGC	CTTGTGCAAG	AGCGATGATT
TGTTTTTTGA	CATCTCAGAA	GACGGATTGT	CAAACCTCA	GGTAATGGCA	AGATAAGTTG	TGTTTTTGGG	GAGCTGGGGA
TAAGATTTAG	GGAGTTATAT	ATTAAGTAA	AGGGTTGTAT	ATTTAAGCTT	AATAATATGA	TGTAATATAT	ATATTAAGAC
TGAAACATAC	GGTGCCACTT	TGCACATAAA	CAAAATTAAG	TGGAATTGG	C		

NFP-like3 Transkriptvariante 2 Tremula-Allel

CTCTCTTACA	GTAATATCCT	CCACCACTTG	CAAGCCCAGC	CAAGCACTCA	AGGGTTCACC	TGCCCAGCCA	ACCAGAGTTC
CTTTCCATGT	CAAACCTATG	CCTTCTACCG	AGCCTCAGCT	CCTAACTTCC	TTGACCTTGC	CTCAATCGGT	GACCTTTTCT
CGGTTAGCCG	CCTTATGATA	TCAAAAACAA	GTAACATCTC	CTCTCCAACC	TCACCTCTCA	TCCCCAATCA	ACCCTCTTTT
GTCCCTTTAT	CATGTTCTTG	CAACCCATC	ATCAATAGCA	CTAGCATTTT	CTCTGCAAAC	ATCACATATA	CCATCGAGGC
AGGCAACACT	TTCTACATTG	TCTCGTCTGA	ATACTTCCAA	AACCTTACGA	CCTACCAGTC	TGTTGAGCTT	TTCAACCTTA
CACTTATCCC	CGAACTACTC	GACATAGGAG	TAGAGGTGAT	CTTTCCAATA	TTTTGCAAGT	GTCCTAATCA	AACCCAACCTG
CAAAACAAGG	TGAAGTATCT	GGTATCTTAT	GTTTTTCAGC	CTTCTGATAA	CTTATCTTCA	GTTGCTTCAA	CATTTGGAGT
TGAAACACAA	TCTATTGTTG	ATGTTAATGG	CAATAACACC	CAGCCTTATG	ATACCATATT	CGTTCAGTC	AATCAACTTC
CACAACGGC	ACAGCTTACA	GTAGCTGTTT	CTGTTCCCTT	TGGGGCGCCG	CCCCCTGAGA	AGACAGAGAG	GAAAGGTGTG
ATTATAGGAT	TAGCAGTTGG	GCTAGGAATT	GCTGGGCTTT	TATTGGCCTT	GGTAATTGGG	GTTTGGTTTT	ATAGAGAGGG
TGTGTTGAAG	AAGAGAAGAG	ATGTTGAGAA	AGTTGAGGAG	AAGCGTAGGA	TGCAGTTGAA	TGGGGGAAGG	AAAGGGTTGA
AGGATATAGA	AGTGAATTTG	ATGGCAGATG	TTTCAGATTG	CTTGATAAAG	TACAGGGTCT	TTAAGATTGA	TGAACTGAAA
GAAGCTACTA	ATGGGTTCGG	TGAAAATTGC	TTGATTGAAG	GATCTGTGTT	TAAAGGGTCC	ATAAACGGAG	AGACCTATGC
CATCAAGAAG	ATGAAGTGGA	ATGCCTGTGA	GGAGCTCAAG	ATATTGCAGA	AGGTAAACCA	TGGCAACTTG	GTGAAGCTAG
AGGGCTTTTG	CATAGACCCC	GAGGATGCAA	ATTGCTATCT	GGTCTACGAG	TTCGTAGACA	GTGGCTCTCT	ACATTCGTGG

6 Anhang

TTGCATCGCA	ACGAGAGAGA	AAAAC TAAGC	TGGAAAACAA	GGTTACGCAT	TGCAATTGAT	GTTGCAAATG	GTCTCCAATA
CATCCATGAG	CACACTAGGC	CAAGGGTTGT	GCACAAAGAC	ATTAAAAGCA	GCAATATCCT	CTTGGACTCG	AGCATGAGAG
CCAAAATTGC	CAACTTTGGA	CTGGCAAAAA	CAGGCTGCAA	CGCCATAACA	ATGCACATTG	TTGGCACTCA	AGGCTACATT
GCGCCTGAAT	ATTTAGCTGA	TGGTGTGGTG	TCAACGAGAA	TGGATGTTTT	CTCTTTTGGT	GTGGTTTTGC	TTGAGCTAAT
CTCAGGAAGA	GAAGCAATTG	ATGAAGGAGG	CAAGGTTCTG	TGGGCAGAAG	CTATTGGAAT	TCTGGATGGA	AATGTTGAAG
AGAGGAAGGT	GAAGAGATTG	ACAGCATGGA	TGGACAAGGT	TCTTTTAGAG	GAGTCATGCT	CAATGGAGAG	TGTAGTGAAT
ACAATGGCTG	TTGCAATTGC	TTGCTTG CAT	AGAGATCCAT	CAAAGAGGCC	TAGCATGGTG	GATATTGTCT	ATGCCTTG TG
CAAGAGCGAT	GATTTGT TTT	TTGACATCTC	AGAAGACGGA	TTGTCAAACC	CTCAGGTAAT	GGCAAGATAA	GTTGTGTTTT
TGGGGAGCTG	GGGATAAGAT	TTAGGGAGTT	ATATATTTAA	GTAAAGGGTT	GTATATTTAA	GCTTAATAAT	ATGATGTAAT
ATATATATTA	AGACTGAAAC	ATACGGTGCC	ACTTTGCACA	TAAACAAATT	AAAGTGGAAG	TTGGC	

NFP-like4 Alba-Allel

AATACAAAAC	ATTGCAAGGC	AGAACAACCA	AGCCAAAAAT	GACAGCCAAA	TCCCATCTAG	TCTTCTCTCT	CCTCTTTTTT
ATCTATTACA	GTACTATCCT	CCACCATTG	CAAGCCCAAC	CAAGCACCCA	AGGATTACCC	TGCACAGCCA	ATCAGAGTTC
CTTTCCATGC	CAAACCTATG	CCTTCTACCG	GGCTACGGCT	CCTAACTTCC	TTGACCTTTC	CTCAATCGGT	GACCTTTTCT
CGGTTAGCCG	CCTTATGATA	TCAAAAACCA	GTAACATCTC	CTCTCCAGCC	TCTCCTCTCA	TCCCCAATCA	ACCCTTGTTT
GTCCTTTTAT	CATGTTCTTG	CAACACCATG	AATGGCACTA	GCATCTCCTT	TGCAAACATC	ACATATACCA	TAAAGCCAGA
TGACACTTTC	TACCTTGCT	CAACTGAATC	CTTCGGAAAC	CTTACTACCT	ACCAGTCTGT	TGAACTGTG	AACCTACGC
TTATCCCCAC	ACGACTCCCA	ATAGGAGTAG	AAGTGATCTT	TCCAATATTT	TGCAAGTGTC	CTAATCAAAC	TCAATTGCAA
AACAAGGTGA	ATTATCTGGT	ATCTTATGTG	TTTCAGCCTT	CTGATAACTT	ATCATCAGTT	GCTTCAACAT	TTGGAGTCGA
AACACAATCT	ATTGTGGATG	CTAATGGCAA	TAACATACAG	CCTTTTGATA	CCATATTCAT	ACCAGTAAAT	CAACTTCCAC
AACTGGCACA	ACCTACGGTT	TTTCCTTCTT	TGGCGCCTTC	TGGGAAGACT	CAGAGGAAAG	GTTTGATCAT	AGGATTAGCA
GTTGGACTAG	GAATTGCCGG	GCTTTTGTTG	GTCTTGTTAA	GCGGGGTTTG	TTTTTATAGA	GACGGTGTAT	TGAAGAAGAG
AAGAGATTTT	GAGAGAGATG	ATCAGGAGAA	GCAGAGGATG	CAGTTCAATG	GAGGAAGGAA	AGGGTTGAAG	GATATAGAAG
TGAGTTTGAT	GGCAGATGTT	TCAGATTGCT	TGGATAAGTA	CATGGTTTTT	AAGATTGATG	AACTGAAAGA	AGCTACTGAT
GGGTTCGGTG	AGAATTGCTT	GATTGAAGGA	TCTGTGTTTA	AAGGGTCCAT	AAATGGAGAG	ACCTATGCTA	TCAAGAAGAT
GAAGTGGGAT	GCCTGTGAGG	AGCTCAAGAT	ATTGCAGAAG	GTAAACCATG	GCAACTTGGT	GAAGCTAGAA	GGCTTTTGCA
TAGACCCTGC	GGATGCAAAT	TGCTATCTGG	TCTACGAGTA	CGTCGACAAT	GGCTCTCTGC	ATTCTGTGGT	ACATGGTAAC
GAGAAAGAAA	AACTAAGCTG	GAAAGCAAGG	TTACGCATTG	CAATTGACGT	TGCAAATGGT	CTCCAATACA	TCCATGAGCA
CACCAGGCCA	AGGGTTGTAC	ACAAAGACAT	TAGAAGCAGC	AACATTCCTC	TAGACTCGAG	CATGAGAGCC	AAGATTGCCA
ACTTCGGACT	AGCAAAATCA	GGCTACAATG	CCATAACAAT	GCACATTGTC	GGCACCCAAG	GCTACATTGC	ACCTGAATAT
TTAGCTGACG	GTGTGGTGTC	AACAAGAATG	GATGTTTTCT	CATTTGGTGT	GGTTTTGCTT	GAGCTAATCT	CCGGCAAAGA
AGCAATTGAC	GAAGAAGGCA	AGGCTTTGTG	GGCAGAAGCT	AGTGGAATTT	TGGAGGGAAA	TGTTGAAGAG	AGGAAGGTGA
AGAGATTGAC	ACAATGGATG	GATAAGGTTT	TTTTAGAGCA	GTCATGCTTG	ATGGAGAGTG	TAATGAATGC	AATGGTTGTT
GCAATTGCTT	GCTTG CATAG	AGATCCATCA	AAGAGGCCCA	GCATGGTGGA	TATTGTTTAT	GCCTGTGTGA	AGACCGATGA
TCTGTTTTTT	GACATCTCAG	AAGACGTATT	GTGACACCTT	CAGGTAATGG	CAAGATAAGT	TATTATCATT	TTTAGGATCT
GGAGATAAGA	TTTTGGTAGT	TAAGGATTTT	ATATGTATAT	ATATGAGCTT	TGATAATATG	ATGTAACATA	TATACGTATG
TTTACAAAGT	TAGCTGTATA	AAATCTTCTG	GAACCGTATA	ATGCCATTTT	GTACCTGAAC	AAAAATGGAT	CTTGCTGTGT
TTAAAAGGCG	TTCTGGATTT	GGAACCCTAT	AATGCTATCC	TGTTCTTGAA	CAAATTGAAG	TTGGCGGTGC	TGTTTT

NFP-like4 Tremula Allel

AACACAAAAC	ATTGCAAGGC	AGAAAGGCAG	AACAACCAAG	CCAAAAATGA	CAGCCAAATC	CCATCTGGTC	TTCTCTCTCC
TCTTTTTTAT	CTATTACAGT	ACCATCCTCC	ACCATTGCA	AGCCCAACCA	AGCACCCAAG	GATTACCTG	CACAGCCAAT
CAGAGTTCCT	TTCCATGCCA	AACCTACGCC	TTCTACCGGG	CTACGGCTCC	TAACCTCCTT	GACCTTTCCT	CAATCGGTGA
CCTTTTCTCG	GTTAGCCGCC	TTATGATATC	AAAACCAAGT	AACATCTCCT	CTCCAGCCTC	CCCTCTCATA	CCCAATCAAC
CCTTGTTTGT	CCCTTTATCA	TGTTCTTGCA	ACACCATGAA	TGGCACTAGC	ATCTCCTTTG	CAAACATCAC	ATATACCATA
AAGCCAAATA	ACACTTCTTA	CCTTGCTCTA	ACTGAATACT	TCGGAAACCT	TACTACCTAC	CAGTCTGTTG	AACTTGTTAA
CCCTACGCTT	ATCCCCACAC	TACTCCCAAT	AGGAGTAGAA	GTGATCTTTC	CAATATTTTG	CAAGTGTCTT	AATCAAACCTC
AATTGCAAAA	CAAGGTGAAT	TATCTGGTAT	CTTATGTGTT	TCAGCCTTCT	GATAACTTAT	CATCAGTTGC	TTCAACATTT
GGAGTCGAAA	CACAATCTAT	TGTGGATGCT	AATGGAAATA	ACATACAGCC	TTTTGATACC	ATATTCATAC	CAGTAAATCA

6 Anhang

```

ACTTCCACAA CTGGCACAAAC CTACGGTTTT TCCTTCTTTG GCGCCTTCTG GGAAGACTGA TCAGAGGAAA GGTTCATCA
TAGGATTAGC AGTTGGACTA GGAATTGCGG GGCTTTTGTG GGTCTTGTTA AGCGGGGTTG GTTTTTATAG AGACGGTGTG
TTGAAGAAGA GAAGAGATTT TGAGAGAGAC GATCAGGAGA AGCAGAGGAT GCAGTTCAAT GGAGGAAGGA AAGGGTTGAA
GGATATAGAA GTGAGTTTGA TGGCAGATGT TTCAGATTGC TTGGATAAGT ACAGGGTCTT TAAGATTGAT GAACTGAAAG
AAGCTACTGA TGGGTTTCGGT GAGAATTGCT TGATTGAAGG ATCTGTGTTT AAAGGGTCCA TAAATGGAGA GACCTATGCC
ATCAAGAAGA TGAAGTGGGA TGCCTGTGAG GAGCTCAAGA TATTGCAGAA GGTAACCAT GGCAACTTGG TGAAGCTAGA
AGGCTTTTGC ATAGACCCTG CGGATGCAAA TTGCTATCTG GTCTACGAGT ACGTCGACAA TGGCTCTCTG CATTCGTGGT
TACATGGTAA CGAGAAAGAA AAATAAGCT GGAAAACAAG GTTACGCATT GCAATTGACG TTGCAAAATGG TCTCCAATAC
ATCCATGAGC ACACCAGGCC AAGGGTTGTA CACAAGACA TTAGAAGCAG CAACATTCTC TTAGACTCGA ACATGAGAGC
CAAGATTGCC AACTTCGGAC TAGCAAAATC AGGCTACAAT GCCATAACAA TGCACATTGT CCGCACCCAA GGCTACATTG
CACCTGAATA TTTAGCTGAC GGTGTGGTGT CAACAAGAAT GGATGTTTTT TCATTGGGTG TGGTTTTGCT TGAGCTAATC
TCAGGCCAAG AAGCAATTGA CGAAGAAGGC AAGGCTTTTGT GGGCAGAAGC TAGTGAATTT TTGGAGGGAA ATGTTGAAGA
GAGGAAGGTG AAGCGATTGA CACCATGGAT GGATAAGGTT CTTTTAGAGC AGTCAAGCTT AATGGAGAGT GTAATGAATG
CAATGGTTGT TGCAATTGCT TGCTTGCATA GAGATCCATC AAAGAGGCCT AGCATGGTGG ATATTGTTTA TGCCTTGTGT
AAGACCGATG ATCTGTTTTT TGACATCTCA GAAGACGTAT TGTCAGACCC TCAGGTAATG GCAAGATAAG TTATTATCAT
TTTTAGGATC TGGAGATAAG ATTTTGGTAG TTTAGGATTT TATATGTATA TATATGACCT TTGATAATAT GTTGTAACAT
ATATACGTAT GTTTACAAAG TTAGCTGTAT AAAATCTTCT GGAACCGTAT AATGCCATTT TGTACCTGAA CAAAAATGGA
TCTTGCTGTG TTTAAAAGGC GTTCTGGATT TGAACCCCTA TAATGCTACC TTGTTCTTGA ACAAATTGAA GTTGGCGGTG
CTGTTTTTCT TGTC

```

6.1.3 Aminosäuresequenzen

Die Proteinsequenzen wurden unter Verwendung des *ExPasy Translate Tools* (https://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna_aa) anhand der für in *P. × canescens* angegebenen Transkriptsequenzen der Tsai AspenDB (<http://aspendb.uga.edu/index.php/databases/spta-717-genome>) berechnet. Es ist jeweils die Proteinsequenz des Alba- und Tremula-Allels im Einbuchstaben-Code aufgeführt. Gelb unterlegt ist das Startcodon des Leserasters das über ein ATG ein Methionin (M) kodiert, weitere Methionine in der Sequenz sind unterstrichen; rot unterlegt: Stopcodon des Leserasters, die Stopcodonen werden über die genomischen Sequenzen TAG, TGA und TAA kodiert, weitere zusätzlich zu dem terminalen vorhandene Stopcodonen sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

NFP-like1 Alba-Allel

```

MAISLLPFFS TQALLLLILL FSSTYVTSQA PPANFSCPV DSPTTCSTYF TYLARPPNFL DLGNISDLFG VTRKEIAAAS
NLESVDTPLF PNQLLLVPKP CGCTGNLSFA NITYQIQGD SIYLVSTTSF ENLTRWQVEE ALNPSLTPTL LHAGDKVIFP
LSCKCPKSTH LERGIAYLIT YAWQPSDDL T KVAAKLNSE RSIVIENNCV NFTAAYVLPV FIPVSQPLVL SQQYPSPEER
ESRNRWIIIV AASIASALLI FLIIAFLAHK RCSIYKRTKAL DRTGSCLETS DLNQTKELETK LESFEAKMTP DKLLPGVSGY
LGKPIIYEVK EIMEGTMDLN EHYKIGGSVY RAKINGRVLV VKKTKDDVTE ELKILQKVSH ASLVKLMGMS SGFDREGNRF
LVYEYAENRS LEKWLHPISE SSSSAGFLT WSQRLHVALD VANGLQYMHE HTQPSIVHKD IRTTNILLDS TFRAKIANFS
MARPAIDSLM PKVDVFDYGV VLLQLLSGKK AMVTKENGEI VLLCKEIKAV LVIEEKREES LRKWMDPYLE RFPYIDSALS
SATLARLCTL BESSERPSMA EIVFNLTVLT QSSPETFERW TSGMETENFT RLISPVTAR*
```

6 Anhang

NFP-like1 Tremula-Allel

MAISLLPFFS	TQALLLLILL	FSSTHVSLQA	PPASNFSCPV	DSPTTCSTYF	TYLARPPNFL	DLGNISDLFG	VTRKEIAAAS
NLESEDPLF	PNQLLLVPKP	CGCTGNLSFA	NITYQIQQGD	SIYLVSTTSF	ENLTRWQEVE	ALNPSLTPAL	LDAGDKVIFP
LFCKCPSKTH	LESGIAYLIT	YVWQPSDDLT	KVAAKLNASE	RNIVIENHYV	NFTAAVYLPV	LIPVSQLPVL	SQQYPSPERR
ESRNRWIIIV	AASIASALLI	FLLIAFLAHK	RCSYKRTKAL	DRTGSCLETC	DLNQTKEGTK	LESFEAKVTP	DKLLPGVSGY
LGKPIIYEVK	EIMEGTMDLN	EHYKIGSVYR	AKINGRVLAV	KKTKDDVTKE	LKILQKVNHA	NLVKLMGMSS	GFDREGNRFI
IYEFAENGLS	EKWLNPSTSES	SSSSAGFLTW	SQRLHVALDV	ANGLQYMHEH	TQPSIVHKDI	RTMNILLDST	FRAKIANFSM
ARPATDSLMP	KVDVFDYGVV	LLQLLSGKKA	MVTKEIGEIV	LLCKEIKAVL	EIEEKREESL	RKWMDFCLER	FYPIDSAPSL
ATLARLCTLE	ESSERPSMAE	IVFNLTVLTO	SSPETFERWT	SGMETENFTP	LISPVTTR		

NFP-like3 Transkriptvariante 1 Alba-Allel

KAELSRTKMR	PASRLVSSLF	FFLSYSNILH	HLQAQPSTQG	FTCPANQSSF	PCQTYAFYRA	SAPNFLDLAS	IGDLFSVSRL
MISKPSNISS	PTSPLIPNQP	LFVPLSCSCN	PINSTNISSA	NITYTIEAGN	TFYIVSSEYF	QNLTTYQSVE	LFNPTLIPEL
LDIGVEVIFP	IFCKCPNQTQ	LQNKVNYLVS	YVFQPSDNLS	SVASTFGVET	QSIVDVNGNN	IQPYDTIFVP	VNQLPQLAQP
TVAVPVPSGA	PPPEKTERKG	VIIGLAVGLG	IAGLLLVLSV	GVWFYREGLL	KKRRDVEKVE	EKRMRQLNGG	RKGLKDIEVN
LMADVSDCLD	KYRVFKIDEL	KEATNGFGEN	CLIEGSVFKG	SINGETYAIK	KMKWNACEEL	KILQKVNHN	LVKLEGFCID
PEDANCYLVY	EFVDNGSLHS	WLHRNEREKL	SWKTRLRVAI	DVANGLQYIH	EHTRPRVVHK	DIKSSNILLD	SSMRAKIANF
GLAKTGCNAI	TMHIVGTQGY	IAPEYLADGV	VSTRMDVFSF	GVVLELISG	REAIDEGGKV	LWAEAIGILD	GNVEERKVKR
LTAWMDKVL	EESCSMESV	NTMAVAIACL	HRDPSKRPSM	VDIVYALCKS	DDLFFDISED	GLANPQVMAR	VVFLGSW**
DLGSN*SKGL	YI*A**YDVI	YILRLKHTVP	LCT*TN*SGNW				

NFP-like3 Transkriptvariante 2 Alba-Allel

LSYSNILHHL	QAQPSTQGFT	CPANQSSFP	QTYAFYRASA	PNFLDLASIG	DLFSVSRLMI	SKPSNISSPT	SPLIPNQPLF
VPLSCSCNPI	NSTNISSANI	TYTIEAGNTF	YIVSSEYFQN	LTTYQSVELF	NPTLIPELLD	IGVEVIFPIF	CKCPNQTQLQ
NKVNYLVSYV	FQPSDNLSSV	ASTFGVETQS	IVDVNGNNIQ	PYDTIFVPVN	QLPQLAQPTV	AVPVPSGAPP	PEKTERKVI
IGLAVGLGIA	GLLLVLVSGV	WFYREGLLKK	RRDVEKVEEK	RRMQLNGGRK	GLKDIEVNLM	ADVSDCLDKY	RVFKIDELKE
ATNGFGENCL	IEGSVFKGSI	NETYAIKMK	KWNACEELKI	LQKVNHNGLV	KLEGFCIDPE	DANCYLVYEF	VDNGLSHSWL
HRNEREKLSW	KTRLRVAIDV	ANGLQYIHEH	TRPRVVHKDI	KSSNILLDSS	MRAKIANFGL	AKTGCNAITM	HIVGTQGYIA
PEYLADGVVS	TRMDVFSFGV	VLELISGRE	AIDEGGKVLW	AEAIGILDGN	VEERKVKRLT	AWMDKVLLEE	SCSMESVNT
MAVAIACLHR	DPSKRPSMVD	IVYALCKSD	LFFDISEDGL	ANPQVMARV	VFLGSW**DL	GSN*SKGLYI	*A**YDVIYI
LRLKHTVPLC	T*TN*SGNW						

NFP-like3 Transkriptvariante 1 Tremula-Allel

KAELSRTKMR	PASRLVSSLF	FFLSYSNILH	HLQAQPSTQG	FTCPANQSSF	PCQTYAFYRA	SAPNFLDLAS	IGDLFSVSRL
MISKPSNISS	PTSPLIPNQP	LFVPLSCSCN	PIINSTSISS	ANITYTIEAG	NTFYIVSSEY	FQNLTTYQSV	ELFNPTLIPE
LLDIGVEVIF	PIFCKCPNQT	QLQNKVKYLV	SYVFQPSDNL	SSVASTFGVE	TQSIVDVNGN	NTQPYDTIFV	PVNQLPQLAQ
PTVAVPVPSG	APPPEKTERK	GVIIGLAVGL	GIAGLLLALV	IGVWFYREGV	LKKRRDVEKV	EKKRRMQLNG	GRKGLKDIEV
NLMADVSDCL	DKYRVFKIDE	LKEATNGFGE	NCLIEGSVFK	GSINGETYAI	KMKWNACEE	LKILQKVNHG	NLVKLEGFCI
DPEDANCYLV	YEFVDSGLSH	SWLHRNEREK	LSWKTRLRIA	IDVANGLQYI	HEHTRPRVVH	KDIKSSNILL	DSSMRAKIAN
FGLAKTGCNA	ITMHIVGTQG	YIAPEYLADG	VVSTRMDVFS	FGVVLELIS	GREAIDEGGK	VLWAEAIGIL	DGNVEERKVK
RLTAWMDKVL	LEESCSMESV	VNTMAVAIAC	LHRDPSKRPS	MVDIVYALCK	SDDLFFDISE	DGLSNPQVMA	RVVFLGSWG
DLGSYILK	RVVYLSLII*	CNIYIKTETY	GATLHINKLK	WKL			

6 Anhang

NFP-like3 Transkriptvariante 2 Tremula-Allel

LSYSN I LHHL	QAQPSTQGF T	CPANQSS F PFC	QTYAFYRASA	PNFLDLASIG	DLFSVSR L M I	SKPSNISSPT	SPLIPNQPLF
VPLSCSCNPI	INSTSISSAN	ITYTIEAGNT	FYIVSSEYFQ	NLTTYQSVEL	FNPTLIPPELL	DIGVEVIFPI	FCKCPNQ T QL
QNKVKYLVS Y	VFQPSDN L SS	VASTFGVETQ	SIVDVNGNNT	QPYDTIFVPV	NQLPQLAQPT	VAVVPVSGAP	PPEKTERKGV
IIGLAVGLGI	AGLLLLALVIG	VWFYREGVLK	KRRDVEKVEE	KRRMQLNGGR	KGLKDIEVNL	MADVSDCLDK	YRVFKIDELK
EATNGFGENC	LIEGSVFKGS	INGETYAIKK	MKWNACEELK	ILQKVNHG N L	VKLEGFCIDP	EDANCYLVYE	FVDSGSLHSW
LHRNEREKLS	WKTRLRIAID	VANGLQYIHE	HTRPRVVHKD	IKSSNILLDS	SMRAKIANFG	LAKTGCNAIT	MHIVGTQGYI
APEYLADGVV	STRMDVFSFG	VVLELEISGR	EAIDEGGKVL	WAEAIGILDG	NVEERKVKRL	TAWMDKVLLE	ESCSMESV V N
TM A VAVIAC L H	RDPSKR F PS M V	DIVYALCKSD	DLFFDISEDG	LSNPQVMAR R	VVFLGSWG*D	LGSYILK*RV	VYLSLII*CN
IYIKTETYGA	TLHINKLKWK	L					

NFP-like4 Alba-Allel

YKTLQGR T TK	PK M TAKSHLV	FSLLFFIYYS	TILHHLQAQP	STQGFTCTAN	QSSFPCQTYA	FYRATAPNFL	DLSSIGDLFS
VSRLMISKPS	NISSPASPLI	PNQPLFVPLS	CSCNTMNGTS	ISFANITYTI	KPDDTFYLV S	TESFGNL T TY	QSVELVNPTL
IPTRLPIGVE	VIFPIFCKCP	NQTQLQNKVN	YLVSYVFQPS	DNLSSVASTF	GVETQSIVDA	NGNNIQPFD T	IFIPVNL P Q
LAQPTVFP S L	APSGKTQRKG	LIIGLAVGLG	IAGLLLV L VS	GVCFYRDGVL	KKRRDFERDD	QEQRMQ F NG	GRKGLKDIEV
SLMADVSDCL	DKYMVFKIDE	LKEATDGFGE	NCLIEGSVFK	GSINGETYAI	KMKWDACEE	LKILQKVN H G	NLVKLEGFCI
DPADANCYLV	YEYVDNGSLH	SWLHGNEKEK	LSWKARLRIA	IDVANGLQYI	HEHTRPRV V H	KDIRSSNILL	DSSMRAKIAN
FGLAKSGYNA	ITMHIVGTQ G	YIAPEYLADG	VVSTRMDVFS	FGV L LELIS	GKEAIDEEGK	ALWAEASGIL	EGNVEERKVK
RLTQWMDKVL	LEQSCLMESV	MNAMVVAIAC	LHRDPSKRPS	MVDIVYALCK	TDDLFFDISE	DVLSDPQVMA	R R VIIIFRIW
R*DFGS*GFY	MYIYEL**YD	VTYIRMFTKL	AV*NLLEPYN	AILYLNKNGS	CCV*KAFWIW	NPIMLSCS*T	N*SWRCCF

NFP-like4 Tremula-Allel

TQNIARQKGR	TTKPK M TAKS	HLVFSLLFFI	YYSTILHHLQ	AQPSTQGF T C	TANQSSFPCQ	TYAFYRATAP	NFLDLSSIGD
LFSVSR L MIS	KPSNISSPAS	PLIPNQPLFV	PLSCSCNTMN	GTSISFANIT	YTIKPNNTFY	LVSTEYFGNL	TTYQSVELVN
PTLIPTLLPI	GVEVIFPIFC	KCPNQ T QLQ N	KVNYLVSYVF	QPSDNLSSVA	STFGVETQSI	VDANGNNIQP	FDTIFIPV N Q
LPQLAQPTVF	PSLAPSGKTD	QRKGLIIGLA	VGLGIAGLLL	VLVSGVGFYR	DGVLKKRRDF	ERDDQEKQ R M	QFNGGRKGLK
DIEVSLMADV	SDCLDKYRVF	KIDELKEATD	GFGENCLIEG	SVFKGSINGE	TYAIKK M KWD	ACEELKILQK	VNHGNLVKLE
GFCIDPADAN	CYLVYEYVDN	GSLHSWLHGN	EKEKLSWKTR	LRIAIDVANG	LQYIHEHTRP	RVVHKDIRSS	NILLDSNM R A
KIANFGLAKS	GYN A ITMHIV	GTQGYIAPEY	LADGVVSTRM	DVFSFGVLL	ELISGKEAID	EEGKALWAEA	SGILEGNVEE
RKVRLTPW M	DKVLL E QSSL	MESVMNAMVV	AIACLHRDPS	KRPSMVDIVY	ALCKTDDLFF	DISEDVLSDP	QVMAR R VIII
FRIWR*DFGS	LGFYMYIYDL	**YVVTYIRM	FTKLAV*NLL	EPYNAILYLN	KNGSCCV*KA	FWIWNPIMLP	CS*TN*SWRC

CFSC

6.1.4 Inserierte Sequenzen

Bei den Linien N481-97 und N482-47 wurden mehrere Nukleotide inseriert, die inserierten Sequenzen sind in Tabelle 7.1 angegeben.

Tabelle 7.1: Inserierte Sequenzen an der CRISPR/Cas9-Schnittstelle ausgewählter Linien

Angegeben ist die inserierte Nukleotidsequenz in Abhängigkeit der transgenen Linie und des Allels. nt: Nukleotide.

Linie	Allel	Sequenz der Insertion
N481-97	Alba	GTTTTTCTTT AAGTTTAGTT TAGTCGAAAG TCACAA (36 nt)
N481-97	Tremula	CCCCAGAATT TGTTCTTCAA GAGTTTCGTT CATAATAAAG GC (42 nt)
N482-47	Alba	TTTGGTTTAT CTAGTCTTCC CTTCCCTCCC CCAACATCTG AAGTGGTCGA CTGGCTAGAC CTGAAGGGGA AGAAAGAATT CGGCGTAT (88 nt)

6.2 Vektoren

6.2.1 Vektorkarten

Transformationsvektor A259

Der Transformationsvektor A259 wurde zur Agrobakterien-vermittelnden Transformation in den Pappelklon INRA 717-1B4 (*P. × canescens*, P1) verwendet. Über die T-DNA sollten die gRNAs und die Cas9-Nuklease zur CRISPR/Cas9-vermittelnden Modifikation in *NFP-like1* und *NFP-like2* in den Kontroll-Klon P1 eingebracht werden. Zur Integrationsanalyse in das Pappelgenom wurde das Restriktionsenzym *BclI* verwendet, dessen Schnittmotive im Vektor sind in Abbildung 6.1 dargestellt.

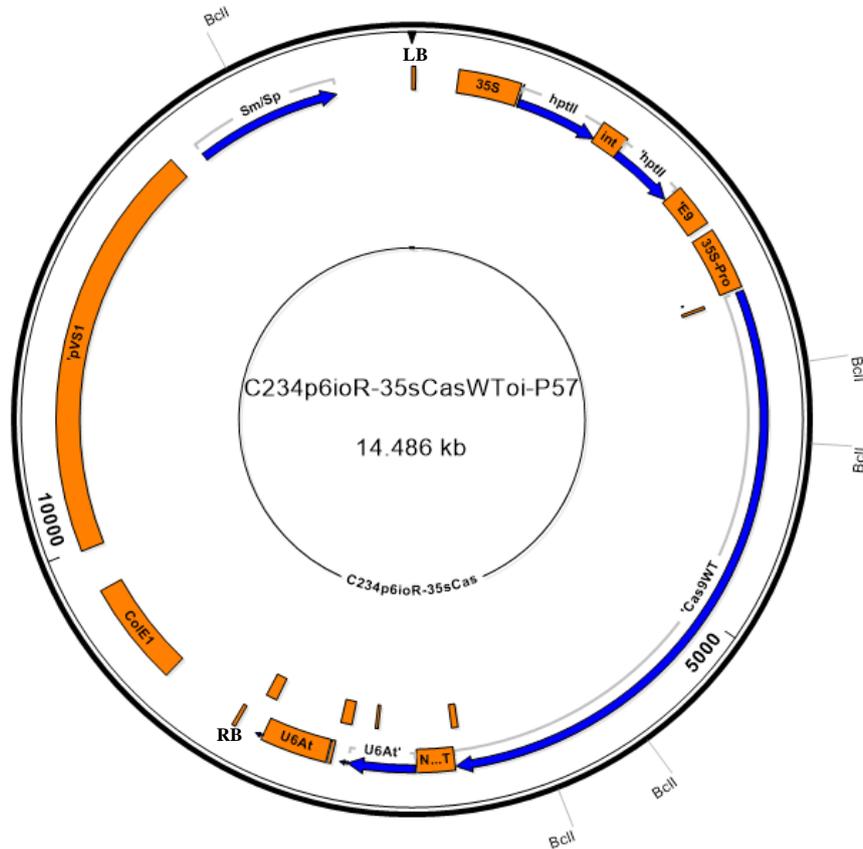


Abbildung 6.1: C234p6ioR-35sCasWToi-P57 Plasmid zur CRISPR/Cas9-Modifikation von *NFP-like1*

LB: left border der T-DNA; 35S: *cauliflower mosaic virus* 35S Promotor; *hph*: kodierende Sequenz der Hygromycin-vermittelnden Resistenz; *int*: StLS1 (*Solanum tuberosum* rbcL-large subunit 1)-Intron; 'E9: Terminator Rbcs-E9 (*Pisum sativum*); 35S-Pro: *cauliflower mosaic virus* 35S Promotor Region; 'Cas9 Wt: Cas9 kodierende Sequenz des Cas9-Wildtyp Gens (*Streptococcus pyogenes*); N...T: Nopalinsynthese Terminator; U6At': U6-Promotor (*Arabidopsis thaliana*), RB: right border der T-DNA; ColE1: Replikationsursprung (*origin of replication*); 'pVS1: Replikationsursprung in *Agrobacterium tumefaciens*; Sm/Sp: kodierende Sequenz der Streptomycin/Spectinomycin-vermittelnden Resistenz. *BclI*: Schnittstellen des *BclI*-Enzyms, verwendet für Southern-Blot-Analysen.

Transformationsvektor A260

Der Transformationsvektor A260 wurde zur Agrobakterien-vermittelnden Transformation in *P. × canescens* verwendet. Über die T-DNA sollten die gRNAs und die Cas9-Nuklease zur CRISPR/Cas9-vermittelnden Modifikation in *NFP-like3* und *NFP-like4* in den Kontroll-Klon P1 eingebracht werden. Zur Integrationsanalyse in das Pappelgenom wurde das Restriktionsenzym *BclII* verwendet, dessen Schnittmotive im Vektor sind in Abbildung 6.2 dargestellt.

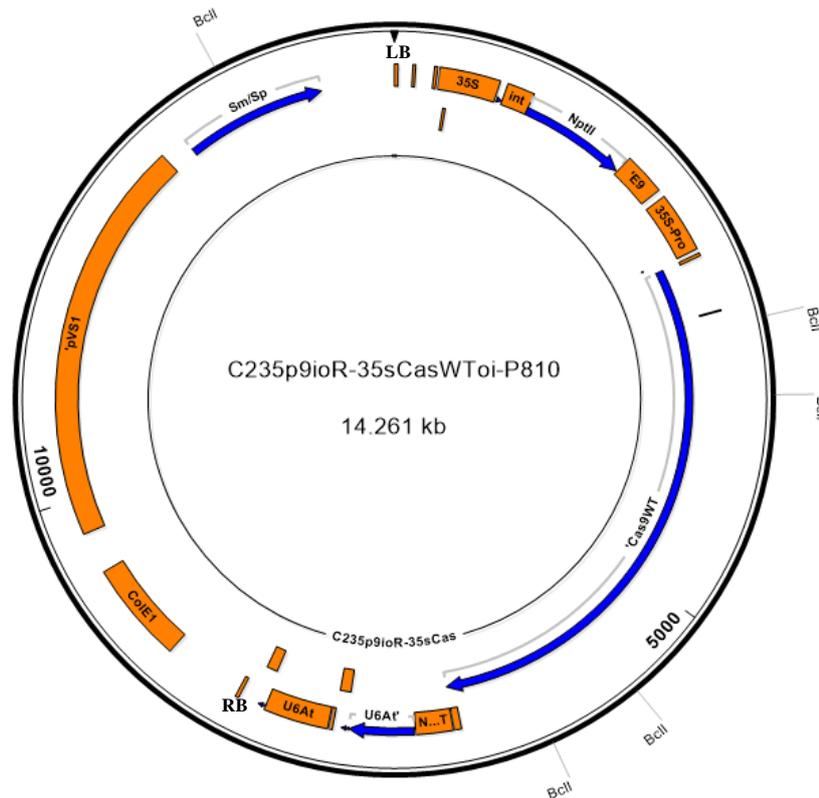


Abbildung 6.2: C235p9ioR-35sCasWToi-P810 Plasmid zur CRISPR/Cas9-Modifikation von *NFP-like3* und *NFP-like4*

LB: left border der T-DNA; 35S: cauliflower mosaic virus 35S Promotor; int: StLS1 (*Solanum tuberosum rbcL-large subunit 1*)- Intron; *NptII*: kodierende Sequenz der Kanamycin-vermittelnden Resistenz; 'E9: Terminator Rbes-E9 (*Pisum sativum*); 35S-Pro: cauliflower mosaic virus 35S Promotor Region; 'Cas9Wt: Cas9 kodierende Sequenz des Cas9-Wildtyp Gens (*Streptococcus pyogenes*); N...T: Nopalinsynthase Terminator; U6At': U6-Promotor (*Arabidopsis thaliana*); RB: right border der T-DNA; CoIE1: Replikationsursprung (*origin of replication*); pVS1: Replikationsursprung in *Agrobacterium tumefaciens*; Sm/Sp: kodierende Sequenz der Streptomycin/Spectinomycin-vermittelnden Resistenz. *BclII*: Schnittstellen des *BclII* Enzyms verwendet für Southern-Blot-Analysen.

6.2.2 Vektorsequenzen

Transformationsvektor A259

GGCAGGATAT	ATTCAATTGT	AAATGGCTTC	ATGTCCGGGA	AATCTACATG	GATCAGCAAT	GAGTATGATG	GTCAATATGG
AGAAAAAGAA	AGAGTAATTA	CCAATTTTTT	TTCAATTCAA	AAATGTAGAT	GTCCGCAGCG	TTATTATAAA	ATGAAAGTAC
ATTTTGATAA	AACGACAAAT	TACGATCCGT	CGTATTTATA	GGCGAAAGCA	ATAAACAAAT	TATTCTAATT	CGGAAATCCT
TATTTGACAG	TGTCTACATT	CACGTCCAAA	TGGGGGCTTA	GATGAGAAAC	TTCACGATCG	GCTCTAGAAC	ATGGTGGAGC
ACGACACTCT	CGTCTACTCC	AAGAATATCA	AAGATACAGT	CTCAGAAGAC	CAGAGGGCTA	TTGAGACTTT	TCAACAAAGG
GTAATATCGG	GAAACCTCCT	CGGATTCCAT	TGCCCAGCTA	TCTGTCACTT	CATCGAAAGG	ACAGTAGAAA	AGGAAGATGG
CTTCTACAAA	TGCCATCATT	GCGATAAAGG	AAAGGCTATC	GTTCAAGATG	CCTCTACCGA	CAGTGGTCCC	AAAGATGGAC
CCCCACCCAC	GAGGAACATC	GTGGAAAAAG	AAGACGTTCC	AACCACGTCT	TCAAAGCAAG	TGGATTGATG	TGATATCTCC
ACTGACGTAA	GGGATGACGC	ACAATCCCAC	TATCCTTCGC	AAGACCCCTC	CTCTATATAA	GGAAGTTCAT	TTCATTTGGA
GAGGACCTCG	AGTCCTCCAT	AACTATGAAG	AAACCGGAGC	TGACCGCCAC	TTCCGTCGAA	AAGTTCCTCA	TCGAGAAGTT
TGATAGCGTG	TCTGACCTTA	TGCAGTTGTC	GGAGGGCGAA	GAGTCCCAGC	CGTTCAGCTT	TGATGTTGGC	GGGCGCGGGT
ACGTCCCTCG	CGTGAACTCT	TGCGCTGACG	GCTTCTATAA	AGATCGGTAC	GTTTACAGGC	ATTTGCGCTC	GGCGGCCCTG
CCTATTCCCG	AAGTCTCGA	CATCGGCGAG	TTTTCCGAGA	GCCTTACGTA	TTGTATTTCC	CGCCGGGCTC	AAGGGGTGAC
CCTCCAGGAT	CTGCCGAAA	CTGAGTTGCC	TGCGGTTCTC	CAGCCCGTCG	CCGAGGCTAT	GGACGCCATC	GCCGCGCGGG
ATCTTTCTCA	AACGTGCGGC	TTGCGGCCGT	TCGCCCCTCA	GGGATTGGC	CAGTACACCA	CTTGAGGGA	CTTTATCTGC
GCTATCGCCG	ATCCGCACGT	GTATCATTGG	CAAACCGTTA	TGGACGATAC	GGTCTCCGCG	AGCGTGGCCC	AGGCTCTGGA
CGAACTCATG	TTGTGGGCCG	AGGATTGCC	CGAGGTAAGT	TTCTGCTTCT	ACCTTTGATA	TATATATAAT	AATTATCATT
AATTAGTAGT	AATATAATAT	TTCAAATATT	TTTTTCAAAA	TAAAAGAATG	TAGTATATAG	CAATTGCTTT	TCTGTAGTTT
ATAAGTGTGT	ATATTTTAAT	TTATAACTTT	TCTAATATAT	GACCAAAT	TGTTGATGTG	CAGGTCCGCC	ACCTGGTTCA
TGCGGACTTC	GGCTCTAATA	ACGTGCTCAC	CGATAATGGG	CGGATTACTG	CCGTCATCGA	CTGGTCCGAA	GCTATGTTTG
GCGATTGCA	GTACGAAGTG	GCGAACATTT	TCTTCTGGAG	GCCTTGCTT	GCCTGCATGG	AACAGCAAAC	GCGCTACTTT
GAGCGGAGGC	ACCCGAGACT	GGCGGGGTCT	CCCCGCCTCA	GGCCTATAT	GTTGCGGATC	GGCCTCGACC	AGCTTTACCA
GTCCCTGGTT	GATGGGAATT	TCGACGATGC	TGCCTGGGCG	CAAGCCCGCT	GTGACGCTAT	TGTCAGGAGC	GGCGCGGGGA
CCGTGGGCCG	CACTCAGATC	GCCC GGCGGT	CGGCTGCCGT	TTGGACGGAT	GGGTGCGTCG	AAGTGCTCGC	GGACAGCGGC
AACAGCGGGC	CTTCCACCCG	CCCGCGGGCC	AAGGAGTGAA	CGCGTTCGAG	TATTATGGCA	TTGGGAAAAC	TGTTTTTCTT
GTACCATTG	TTGTGCTTGT	AATTTACTGT	GTTTTTTTAT	CGGTTTTTCG	TATCGAACTG	TGAAATGGAA	ATGGATGGAG
AAGAGTTAAT	GAATGATATG	GTCTTTTGT	TCATTCTCAA	ATTAATATTA	TTTGTTTTTT	CTCTTATTTG	TTGTGTGTTG
AATTTGAAAT	TATAAGAGAT	ATGCAAACAT	TTTGTTTTGA	GTAAAAATGT	GTCAAATCGT	GGCCTCTAAT	GACCGAAGTT
AATATGAGGA	GTAAAACACT	GAAGCCTGCA	GGCATGCAAG	CTGATCCACT	AGAGGCCATG	GCGGCCGCAC	TAGATCAACA
TGGTGGAGCA	CGACACTCTC	GTCTACTCCA	AGAATATCAA	AGATACAGTC	TCAGAAGACC	AGAGGGCTAT	TGAGACTTTT
CAACAAAGGG	TAATATCGGG	AAACCTCCTC	GGATTCCATT	GCCCAGCTAT	CTGTCACTTC	ATCGAAAGGA	CAGTAGAAAA
GGAAAGATGGC	TTCTACAAAT	GCCATCATTG	CGATAAAGGA	AAGGCTATCG	TTCAAGATGC	CTCTACCGAC	AGTGGTCCCA
AAGATGGACC	CCCACCCACG	AGGAACATCG	TGGAAAAAGA	AGACGTTCCA	ACCACGTCTT	CAAAGCAAGT	GGATTGATGT
GATATCTCCA	CTGACGTAAG	GGATGACGCA	CAATCCCACT	ATCCTTCGCA	AGACCCTTCC	TCTATATAAG	GAAGTTCATT
TCATTTGGAG	AGGACACTAG	TTGGATCCTC	CATAACTATG	GCCCCAAGA	AGAAGCGCAA	AGTGGGAATC	CACGGAGCTC
CAGACAAGAA	GTACAGCATT	GGTCTGGACA	TCGGGACCAA	CTCCGTCGGC	TGGGCCGTTA	TCACCGATGA	GTACAAAGTG
CCTTCTAAGA	AGTTCAAAGT	CCTCGGAAAC	ACTGACAGGC	ACAGCATCAA	GAAGAAGTTG	ATTGGCGCCC	TTCTCTTCGA
CTCCGGCGAA	ACCGCTGAGG	CCACCCGTCT	GAAGCGCACC	GCCAGAAGGC	GCTACACCCG	TCGCAAGAAT	AGGATCTGCT
ACCTCCAGGA	GATCTTCAGC	AACGAGATGG	CCAAAGTGGA	CGATTCCCTC	TTTACCCTT	TGGAGGAGAG	CTTCTTGTC
GAGGAGGACA	AGAAGCACGA	GCGCCATCCC	ATCTTCGGAA	ACATTGTTGA	CGAGGTGGCT	TACCACGAGA	AGTATCCAAC
TATCTACCAC	CTCAGAAAAG	AGCTGGTGGA	CTCCACCGAC	AAGGCCGATT	TGAGGCTCAT	CTACCTTGCC	CTCGCTCACA
TGATCAAGTT	CCGCGGTCAC	TTCCTGATTG	AGGGCGACCT	CAACCCCGAC	AACTCTGACG	TCGATAAGTT	GTTTCATCAA
CTGGTCCAGA	CCTACAACCA	GCTTTTCGAG	GAGAATCCTA	TCAACGCTC	CGGGGTTGAC	GCCAAAGGCTA	TTCTCAGCGC
CCGTCTGTCC	AAGAGCCGCA	GGCTTGAGAA	CTTGATCGCC	CAGCTCCCAG	GAGAGAAGAA	GAACGGCCTC	TTCGGAACC
TGATCGCTCT	CTCCTTGGGC	CTTACCCTTA	ACTTCAAGTC	TAATTTTGAC	CTCGCCGAGG	ACGCCAAGCT	GCAACTCAGC
AAGGACACCT	ACGATGACGA	CTTGACAAC	CTGCTCGCCC	AGATCGGCGA	TCAGTACGCT	GACCTTTTCT	TGGCCGCCAA
GAACCTCTCC	GACGCTATTC	TGCTCTCCGA	CATCCTTCGC	GTGAACACTG	AGATCACCAA	GGCCCCACTG	AGCGCCTCCA
TGATCAAGCG	TTACGACGAA	CACCACCAAG	ATTTGACCCT	CCTCAAGGCT	CTTGTGACAG	AGCAGCTGCC	CGAGAAGTAC
AAGGAGATTT	TCTTCGACCA	GAGCAAGAAC	GGATACGCCG	GTTACATCGA	CGGCGGGGCC	TCCCAAGAGG	AGTTCTACAA

6 Anhang

GTTCATCAAG	CCCATCTTGG	AGAAGATGGA	CGGCACCGAA	GAGCTGCTCT	GAAGCTCAAC	CGCGAGGATC	TTTTGAGGAA
GCAGCGTACC	TTCGACAACG	GATCTATTCC	CCACCAGATC	CATCTCGGCG	AGCTGCACGC	TATCTCCGC	AGGCAAGAGG
ACTTCTATCC	ATTCTTAAG	GACAATCGCG	AGAAGATTGA	AAAGATCCTC	ACTTTTAGAA	TCCCTACTA	CGTCGGACCC
TTGGCCCGTG	GCAACAGCCG	CTTCGCCTGG	ATGACCAGGA	AGTCCGAGGA	AACCATCACC	CCATGGAAC	TCGAGGAGGT
GTTTGACAAG	GGGGCCAGCG	CTCAGTCTTT	CATTGAGCGC	ATGACCAACT	TCGATAAGAA	CCTGCCCAAC	GAGAAAAGTCC
TCCCAAAGCA	CTCCCTTCTG	TACGAGTACT	TCACTGTCTA	CAATGAGTTG	ACCAAAGTGA	AGTACGTGAC	CGAGGGTATG
CGTAAGCCTG	CCTTCCTCAG	CGGCAGCAG	AAGAAGGCCA	TCGTTGACCT	CCTGTCAAG	ACCAACAGGA	AAGTCACCGT
GAAGCAGCTT	AAGGAGGACT	ACTTCAAGAA	GATCGAGTGC	TTTACTCTG	TCGAGATCAG	CGGAGTGGAG	GATCGCTTCA
ACGCTTCCTT	GGGCACTTAC	CACGACCTCC	TGAAGATTAT	CAAGGACAAG	GACTTCTCG	ACAACGAGGA	GAACGAAGAT
ATCTTGGAGG	ACATCGTTCT	TACCCTCACC	CTGTTGAGG	ACAGAGAGAT	GATTGAGGAA	CGCCTAAGA	CCTACGCCCA
CTGTGTCGAC	GATAAAGTCA	TGAAGCAACT	TAAGCGTAGG	CGCTACACCG	GATGGGGCAG	GCTGTCCCGT	AAGCTCATCA
ACGGTATCCG	CGACAAGCAG	AGCGGCAAGA	CTATTCTCGA	CTTCTTGAAG	TCCGACGGAT	TCGCCAATCG	CAACTTTCATG
CAGCTGATCC	ACGACGATTC	TCTTACCTTC	AAGGAGGACA	TCCAAAAGGC	TCAAGTGTCC	GGCCAGGGCG	ACAGCCTCCA
CGAGCACATC	GCCAACCTGG	CCGGGAGCCC	CGCTATTAAG	AAGGGAATCC	TCCAGACCGT	CAAGGTGGTT	GACGAGTTGG
TCAAGGTGAT	GGGCAGACAT	AAGCCAGAGA	ACATCGTCAT	CGAGATGGCC	AGGGAAAACC	AGACCACCCA	GAAGGGACAG
AAGAACTCCC	GTGAGCGCAT	GAAGAGGATT	GAGGAGGGCA	TCAAGGAGCT	TGGTCCCAG	ATCCTCAAGG	AGCACCCCGT
GGAAAACACC	CAACTCCAGA	ATGAGAAGCT	GTATTTGTAC	TACCTTCAGA	ACGGGCGCGA	TATGTACGTT	GACCAAGAGC
TGGACATCAA	CCGCCTCAGC	GACTACGACG	TGGATCACAT	TGTCCCTCAG	TCCTTTCTCA	AGGACGACTC	TATCGACAAC
AAGGTGTTGA	CTAGAAGCGA	TAAGAACCGC	GGCAAGTCCG	ACAACGTCCC	ATCCGAGGAG	GTGGTCAAGA	AGATGAAGAA
TTACTGGAGG	CAGCTGCTTA	ACGCCAAGCT	CATCACCCAG	CGCAAGTTCG	ACAACCTGAC	CAAGGCCGAG	CGTGGAGGCC
TCAGCGAACT	GGACAAGGCT	GGATTCATCA	AGAGGCAACT	TGTTGAAACC	CGCCAGATTA	CCAAGCACGT	GGCCAGATC
CTCGACTCCC	GTATGAACAC	TAAGTACGAT	GAGAACGACA	AGCTGATCCG	CGAGGTCAAA	GTGATTACCC	TCAAGAGCAA
GTCGTGTCT	GACTTCAGAA	AGGACTTCCA	ATTCTACAAG	GTTAGGGAGA	TCAACAATA	CCACCACGCC	CACGATGCTT
ACCTTAATGC	CGTGGTCGGC	ACCGCCTTGA	TCAAAGAAGTA	CCCCAAGCTG	GAGTCCGAGT	TCGTGTATGG	TGACTACAAG
GTCTACGACG	TTCGCAAGAT	GATCGCTAAG	AGCGAGCAGG	AGATTGGCAA	GGCCACCGCC	AAGTACTTCT	TCTACTCCAA
CATCATGAAC	TTCTTTAAGA	CCGAGATCAC	TTTGCTAAC	GGGGAGATCC	GTAAGCGCCC	TCTCATTGAA	ACCAACGGAG
AAACCGCGCA	GATCGTGTGG	GACAAGGGCA	GGGACTTTCG	CACCGTCAGA	AAAGTGTGA	GCATGCCCCA	AGTCAACATC
GTGAAGAAAA	CCGAGGTTCA	GACTGGAGGC	TTCTCCAAGG	AGTCTATCCT	CCCAAAGCGC	AATTCCGATA	AGTTGATTGC
CCGTAAGAAG	GACTGGGACC	CCAAGAAGTA	CGGTGGATTC	GACAGCCCAA	CCGTCGCCTA	CTCCGTGCTT	GTCGTGGCTA
AAGTTGAGAA	GGGCAAGAGC	AAGAAGCTCA	AGTCCGTCAA	GGAGCTGCTC	GGGATCACCA	TCATGGAGCG	CAGCTCCTTC
GAGAAGAACC	CTATTGATTT	CCTTGAGGCC	AAGGGCTACA	AGGAAGTGAA	GAAGGACTTG	ATCATCAAGC	TCCCCAAGTA
CTCTCTGTTC	GAGCTTGAGA	ACGGAAGGAA	GCGTATGCTC	GCCTCCGCTG	GCGAGCTGCA	AAAGGGAAAC	GAGTTGGCCC
TCCCAAGCAA	GTACGTCAAC	TTCTGTACC	TCGCCTCCA	CTATGAGAAG	CTCAAGGGCA	GCCCCGAGGA	CAACGAACAG
AAGCAGTTGT	TTGTGGAGCA	GCATAAGCAC	TACCTTGACG	AGATCATTGA	GCAGATCAGC	GAGTCTCCA	AGCGCGTTAT
CCTGGCTGAC	GCCAATCTCG	ATAAAGTCCT	TTCTGCCTAC	AACAAGCACA	GGGACAAGCC	TATCAGAGAG	CAGGCTGAAA
ACATTATCCA	CTTGTTCCACC	CTCACCAACC	TGGGTGCCCC	AGCCGCCTTC	AAGTACTTCG	ACACTACCAT	CGACCGCAAG
CGTTACACCT	CCACCAAGGA	AGTGCTCGAT	GCTACCCTTA	TCCACCAGAG	CATTACTGGG	TTGTACGAAA	CCAGGATCGA
CCTGTCCCAA	CTCGGCGGAG	ACAAGCGCCC	CGCCGCCACC	AAGAAGGCTG	GCCAGGCCAA	GAAGAAGAAG	TAACCCGGGA
TCGTTCAAAC	ATTTGGCAAT	AAAGTTTCTT	AAGATTGAAT	CCTGTTGCCG	GTCTTGCGAT	GATTATCATA	TAATTTCTGT
TGAATTACGT	TAAGCATGTA	ATAATTAACA	TGTAATGCAT	GACGTTATTT	ATGAGATGGG	TTTTTATGAT	TAGAGTCCCG
CAATTATACA	TTTAATACGC	GATAGAAAAC	AAAATATAGC	GCGCAAATA	GGATAAATTA	TCGCGCGCGG	TGTCATCTAT
GTTACTAGAT	CGCTCGAATT	CCTTCGTTGA	ACAACGGAAA	CTCGACTTGC	CTTCCGCACA	ATACATCATT	TCTTCTTAGC
TTTTTTTCTT	CTTCTTCGTT	CATACAGTTT	TTTTTTGTTT	ATCAGCTTAC	ATTTTCTTGA	ACCGTAGCTT	TCGTTTTCTT
CTTTTTAACT	TTCCATTCGG	AGTTTTTGTG	TCTTGTTTCA	TAGTTTGTCC	CAGGATTAGA	ATGATTAGGC	ATCGAACCTT
CAAGAATTTG	ATTGAATAAA	ACATCTTCAT	TCTTAAGATA	TGAAGATAAT	CTTCAAAGG	CCCCTGGGAA	TCTGAAAGAA
GAGAAGCAGG	CCCATTTATA	TGGGAAAGAA	CAATAGTATT	TCTTATATAG	GCCCATTTAA	GTTGAAAACA	ATCTTCAAAA
GTCCCACATC	GCTTAGATAA	GAAAACGAAG	CTGAGTTTAT	ATACAGCTAG	AGTCGAAGTA	GTGATTGTTT	TTCTCGATTC
CACATTTGTT	TTAGAGCTAG	AAATAGCAAG	TTAAAATAAG	GCTAGTCCGT	TATCAACTTG	AAAAAGTGGC	ACCGAGTCGG
TGCTTTTTTTT	TAGACCCAGC	TTTCTTGATC	AAAGTTGGCA	TTACGCTCTT	CGTTGAACAA	CGGAACTCG	ACTTGCCTTC
CGCACAATAC	ATCATTTCTT	CTTAGCTTTT	TTTCTTCTTC	TTCGTTTATA	CAGTTTTTTT	TTGTTTATCA	GCTTACATTT
TCTTGAACCG	TAGCTTTCGT	TTTCTTCTTT	TTAACTTTCC	ATTCGGAGTT	TTTGTATCTT	GTTTCATAGT	TTGTCCCAGG
ATTAGAATGA	TTAGGCATCG	AACCTTCAAG	AATTTGATTG	AATAAAACAT	CTTCATTCTT	AAGATATGAA	GATAATCTTC

6 Anhang

AAAAGGCCCC	TGGGAATCTG	AAAGAAGAGA	AGCAGGCCCA	TTTATATGGG	AAAGAACAAT	AGTATTTCTT	ATATAGGCCC
ATTTAAGTTG	AAAACAATCT	TCAAAAAGTCC	CACATCGCTT	AGATAAGAAA	ACGAAGCTGA	GTTTATATAC	AGCTAGAGTC
GAAGTAGTGA	TTGAGTTGAT	TTGGAAATAA	TGGTTTTAGA	GCTAGAAATA	GCAAGTAAA	ATAAGGCTAG	TCCGTTATCA
ACTGAAAAA	GTGGCACCGA	GTGCGTGCTT	TTTTTGTCGA	CAGGCCTTAA	GGGCCAGATC	TTGGGCCCGG	TACCCGATCA
GATTGTGCTT	TCCCGCCTTC	GGTTTAAACT	ATCAGTGTTT	GACAGGATAT	ATTGGCGGGT	AAACCTAAGA	GAAAAGAGCG
TTTATTAGAA	TAATCGGATA	TTTAAAAGGG	CGTGAAAAGG	TTTATCCGTT	CGTCCATTTG	TATGTGCATG	CCAACCACAG
GGTTCCCTC	GGGAGTGCTT	GGCATTCCGT	GCGATAATGA	CTTCTGTTC	ACCACCCAAA	CGTCGGAAAG	CCTGACGACG
GAGCAGCATT	CCAAAAAGAT	CCCTTGGCTC	GTCTGGGTCG	GCTAGAAAGT	CGAGTGGGCT	GCTGTGGCTT	GATCCCTCAA
CGCGGTGCGG	GACGTAGCGC	AGCGCCGAAA	AATCCTCGAT	CGCAAATCCG	ACGCTGTCTGA	AAAGCGTGAT	CTGCTTGTCTG
CTCTTTCCGC	CGACGTCTCG	GCCAGTCATC	ACGCGCCAAA	GTTCCGTAC	AGGATGATCT	GGCGCGAGTT	GCTGGATCTC
GCCTTCAATC	CGGGTCTGTG	GCGGGAATC	CACGAAAATA	TCCGAACGCA	GCAAGATATC	GCGGTGCATC	TCGGTCTTGC
CTGGGCAGTC	GCCGCCGACG	CCGTTGATGT	GGACGCCGAA	AAGGATCTAG	GTGAAGATCC	TTTTTGATAA	TCTCATGACC
AAAATCCCTT	AACGTGAGTT	TTCGTTCCAC	TGAGCGTCAG	ACCCCGTAGA	AAAGATCAA	GGATCTTCTT	GAGATCCCTT
TTTTCTGCGC	GTAATCTGCT	GCTTGCAAAC	AAAAAACCA	CCGCTACCAG	CGGTGGTTTG	TTTGCCGAT	CAAGAGCTAC
CAACTCTTTT	TCCGAAGGTA	ACTGGCTTCA	GCAGAGCGCA	GATACCAAAT	ACTGTCTTTC	TAGTGTAGCC	GTAGTTAGGC
CACCACCTCA	AGAACTCTGT	AGCACCCGCT	ACATACCTCG	CTCTGCTAAT	CCTGTTACCA	GTGGCTGCTG	CCAGTGGCGA
TAAGTCGTGT	CTTACCGGGT	TGGACTCAAG	ACGATAGTTA	CCGGATAAGG	CGCAGCGGTC	GGGCTGAACG	GGGGGTTCTG
GCACACAGCC	CAGCTTGGAG	CGAACGACCT	ACACCGAAT	GAGATACCTA	CAGCGTGAGC	TATGAGAAAG	CGCCACGCTT
CCCGAAGGGA	GAAAGCGCGA	CAGGTATCCG	GTAAGCGGCA	GGGTCGGAAC	AGGAGAGCGC	ACGAGGGAGC	TTCAGGGGGG
AAACGCCCTG	TATCTTTATA	GTCCGTGTCG	GTTTCGCCAC	CTCTGACTTG	AGCGTCGATT	TTTGTGATGC	TCGTCAGGGG
GGCGGAGCCT	ATGAAAAAAC	GCCAGCAACG	CGGCCTTTTT	ACGGTTCCTG	GCCTTTTGCT	GGCCTTTTGC	TCACATGTTT
TTTCTGCGT	TATCCCTGTA	TTCTGTGGAT	AACCGATTAC	CGCCTTTGAG	TGAGCTGATA	CCGCTCGCCG	CAGCCGAACG
ACCGAGCGCA	GCGAGTCAGT	GAGCGAGGAA	GCGGAAGAGC	GCCTGATGCG	GTATTTTCTC	CTTACGCATC	TGTGCGGTAT
TTCACACCGC	ATATGGTGCA	CTCTCAGTAC	AATCTGCTCT	GATGCCGCAT	AGTTAAGCCA	GTAACCGTGC	GGTGCATGA
AATCCTGGCC	GGTTTGTCTG	ATGCCAAGCT	CGCGCCCTGG	CCGGCGAGCT	TGGCCGCTGA	AGAAACCGAG	CGCCGCCGTC
TAAAAAGGTG	ATGTGTATTT	GAGTAAAACA	GCTTGCGTCA	TGCGGTCGCT	GCGTATATGA	TGCGATGAGT	AAATAAACAA
ATACGCAAGG	GGAACGCATG	AAGGTATATCG	CTGACTTAA	CCAGAAAGGC	GGGTCAGGCA	AGACGACCAT	CGCAACCCAT
CTAGCCCGCG	CCCTGCAACT	CGCCGGGGCC	GATGTTCTGT	TAGTCGATTC	CGATCCCCAG	GGCAGTGCCC	GCGATTGGGC
GGCCGTGCGG	GAAGATCAAC	CGCTAACCGT	TGTGCGCATC	GACCGCCCGA	CGATTGACCG	CGACGTGAAG	GCCATCGGCC
GGCGGACTT	CGTAGTGATC	GACGGAGCGC	CCCAGGCGGC	GGACTTGGCT	GTGTCCGCGA	TCAAGGCAGC	CGACTTCGTG
CTGATTCCGG	TGCAGCCAAG	CCCTTACGAC	ATATGGGCCA	CCGCCGACCT	GGTGGAGCTG	GTTAAGCAGC	GCATTGAGGT
CACGGATGGA	AGGCTACAAG	CGGCCTTTGT	CGTGTGCGGG	GCGATCAAAG	GCACGCGCAT	CGGCGGTGAG	GTTGCCGAGG
CGCTGGCCGG	GTACGAGCTG	CCCATTCTTG	AGTCCCGTAT	CACGCAGCGC	GTGAGCTACC	CAGGCACTGC	CGCCGCCGGC
ACAACCGTTC	TTGAATCAGA	ACCCGAGGGC	GACGCTGCCC	GCGAGGTCCA	GGCGCTGGCC	GCTGAAATTA	AATCAAAACT
CATTTGAGTT	AATGAGGTAA	AGAGAAAATG	AGCAAAAGCA	CAAACACGCT	AAGTGCCGGC	CGTCCGAGCG	CACGCAGCAG
CAAGGCTGCA	ACGTTGGCCA	GCCTGGCAGA	CACGCCAGCC	ATGAAGCGGG	TCAACTTTCA	GTTGCCGGCG	GAGGATCACA
CCAAGCTGAA	GATGTACGCG	GTACGCCAAG	GCAAGACCAT	TACCGAGCTG	CTATCTGAAT	ACATCGCGCA	GCTACCAGAG
TAAATGAGCA	AATGAATAAA	TGAGTAGATG	AATTTTAGCG	GCTAAAGGAG	GCGGCATGGA	AAATCAAGAA	CAACCAGGCA
CCGACGCCGT	GGAAATGCCCC	ATGTGTGGAG	GAACGGGGCG	TTGGCCAGGC	GTAAGCGGCT	GGGTTGTCTG	CCGGCCCTGC
AATGGCACTG	GAACCCCAA	GCCCGAGGAA	TCGGCGTGAG	CGGTGCGAAA	CCATCCGGCC	CGGTACAAAT	CGGCGCGGGC
CTGGGTGATG	ACCTGGTGGA	GAAGTTGAAG	GCGGCGCAGG	CCGCCAGCG	GCAACGCATC	GAGGCAGAAG	CACGCCCCGG
TGAATCGTGG	CAAGCGGCCG	CTGATCGAAT	CCGCAAAGAA	TCCCGGCAAC	CGCCGGCAGC	CGGTGCGCCG	TCGATTAGGA
AGCCGCCCAA	GGGCGACGAG	CAACCAGATT	TTTTCGTTCC	GATGCTCTAT	GACGTGGGCA	CCCGCGATAG	TCGCGCATC
ATGGACGTGG	CCGTTTTCCG	TCTGTGGAAG	CGTGACCGAC	GAGCTGGCGA	GGTGATCCGC	TACGAGCTTC	CAGACGGGCA
CGTAGAGGTT	TCCGCAGGGC	CGGCCGGCAT	GGCGAGTGTG	TGGGATTACG	ACCTGGTACT	GATGGCGGTT	TCCCATCTAA
CCGAATCCAT	GAACCGATAC	CGGGAAGGGA	AGGGAGACAA	GCCCCGGCCG	GTGTTCCGTC	CACACGTTGC	GGACGTACTC
AAGTTCTGCC	GGCGAGCCGA	TGGCGGAAAG	CAGAAAGACG	ACCTGGTAGA	AACCTGCATT	CGGTTAAACA	CCACGCACGT
TGCCATGCAG	CGTACGAAGA	AGGCCAAGAA	CGGCCGCTG	GTGACGGTAT	CCGAGGGTGA	AGCCTTGATT	AGCCGCTACA
AGATCGTAAA	GAGCGAAACC	GGGCGGCCGG	AGTACATCGA	GATCGAGCTA	GCTGATTGGA	TGTACCGCGA	GATCACAGAA
GGCAAGAACC	CGGACGTGCT	GACGGTTCAC	CCCGATTACT	TTTTGATCGA	TCCCGGCATC	GGCCGTTTTT	TCTACCGCCT
GGCACGCCGC	GCCGCAGGCA	AGGCAGAAGC	CAGATGGTTG	TTCAAGACGA	TCTACGAACG	CAGTGGCAGC	GCCGGAGAGT
TCAAGAAGTT	CTGTTTCACC	GTGCGCAAGC	TGATCGGGTC	AAATGACCTG	CCGGAGTACG	ATTTGAAGGA	GGAGGCGGGG

6 Anhang

CAGGCTGGCC	CGATCCTAGT	CATGCGCTAC	CGCAACCTGA	TCGAGGGCGA	AGCATCCGCC	GGTTCCCTAAT	GTACGGAGCA
GATGCTAGGG	CAAATTGCCC	TAGCAGGGGA	AAAAGGTCTGA	AAAGGTCTCT	TTCCTGTGGA	TAGCACGTAC	ATTGGGAACC
CAAAGCCGTA	CATTGGGAAC	CGGAACCCGT	ACATTGGGAA	CCCAAAGCCG	TACATTGGGA	ACCGGTCACA	CATGTAAGTG
ACTGATATAA	AAGAGAAAAA	AGGCGATTTT	TCCGCCTAAA	ACTCTTTAAA	ACTTATTAAA	ACTCTTAAAA	CCCGCCTGGC
CTGTGCATAA	CTGTCTGGCC	AGCGCACAGC	CGAAGAGCTG	CAAAAAGCGC	CTACCCTTCG	GTCGCTGCGC	TCCCTACGCC
CCGCCGCTTC	GCGTCGGCCT	ATCGGGGCCG	CTGGCCGCTC	AAAAATGGCT	GGCCTACGGC	CAGGCAATCT	ACCAGGGCGC
GGACAAGCCG	CGCCGTCGCC	ACTCGACCCG	CGGCGCCAC	ATCAAGGCAC	CGGTGGGTAT	GCCTGACGAT	GCGTGGAGAC
CGAAACCTTG	CGCTCGTTCG	CCAGCCAGGA	CAGAAATGCC	TCGACTTCGC	TGCTGCCCAA	GGTTGCCGGG	TGACGCACAC
CGTGGAACG	GATGAAGGCA	CGAACCCAGT	GGACATAAGC	CTGTTCCGTT	CGTAAGCTGT	AATGCAAGTA	GCGTATGCGC
TCACGCAACT	GGTCCAGAAC	CTTGACCGAA	CGCAGCGGTG	GTAACGGCGC	AGTGGCGGTT	TTCATGGCTT	GTTATGACTG
TTTTTTTGGG	GTACAGTCTA	TGCCCTGGGC	ATCCAAGCAG	CAAGCGCGTT	ACGCCGTGGG	TCGATGTTTG	ATGTTATGGA
GCAGCAACGA	TGTTACGCAG	CAGGGCAGTC	GCCCTAAAAC	AAAGTTAAAAC	ATCATGAGGG	AAGCGGTGAT	CGCCGAAGTA
TCGACTCAAC	TATCAGAGGT	AGTTGGCGTC	ATCGAGCGCC	ATCTCGAACC	GACGTTGCTG	GCCGTACATT	TGTACGGCTC
CGCAGTGGAT	GGCGGCCTGA	AGCCACACAG	TGATATTGAT	TTGCTGGTTA	CGGTGACCGT	AAGGCTTGAT	GAAACAACGC
GGCGAGCTTT	GATCAACGAC	CTTTTGAAAA	CTTCGGCTTC	CCCTGGAGAG	AGCGAGATTC	TCCGCGCTGT	AGAAGTCACC
ATGTTTGTGC	ACGACGACAT	CATTCCGTGG	CGTTATCCAG	CTAAGCGCGA	ACTGCAATTT	GGAGAATGGC	AGCGCAATGA
CATTCTTGCA	GGTATCTTCG	AGCCAGCCAC	GATCGACATT	GATCTGGCTA	TCTTGCTGAC	AAAAGCAAGA	GAACATAGCG
TTGCCTTGGT	AGGTCCAGCG	GCGGAGGAAC	TCTTTGATCC	GGTTCCTGAA	CAGGATCTAT	TTGAGGCGCT	AAATGAAACC
TTAACGCTAT	GGAACTCGCC	GCCCAGCTGG	GCTGGCGATG	AGCGAAATGT	AGTGCTTACG	TTGTCCCACA	TTTGGTACAG
CGCAGTAACC	GGCAAAATCG	CGCCGAAGGA	TGTCGCTGCC	GACTGGGCAA	TGGAGCGCCT	GCCGGCCAG	TATCAGCCCG
TCATACTTGA	AGCTAGACAG	GCTTATCTTG	GACAAGAAGA	AGATCGCTTG	GCCTCGCGCG	CAGATCAGTT	GGAAGAATTT
GTCCACTACG	TGAAAGGCGA	GATCACCAAG	GTAGTCGGCA	AATAATGTCT	AACAATTCGT	TCAAGCCGAC	GCCGCTTCGC
GGCGCGGCTT	AACTCAAGCG	TTAGATGCAC	TAAGCACATA	ATTGCTCACA	GCCAAACTAT	CAGGTCAAGT	CTGCTTTTAT
TATTTTTAAG	CGTGCATAAT	AAGCCCTACA	CAAATTGGGA	GATATATCAT	GAAAGGCTGG	CTTTTCTTG	TTATCGCAAT
AGTTGGCGAA	GTAATCGCAA	CATAGCTTGC	TTGGTCGTTC	CGCGTGAACG	TCGGCTCGAT	TGTACCTGCG	TTCAAATACT
TTGCGATCGT	GTTGCGCGCC	TGCCCGGTGC	GTCGGCTGAT	CTCACGGATC	GACTGCTTCT	CTCGCAACGC	CATCCGACGG
ATGATGTTTA	AAAGTCCCAT	GTGGATCACT	CCGTGCCCC	GTCGCTCACC	GTGTTGGGGG	GAAGGTGCAC	ATGGCTCAGT
TCTCAATGGA	AATTATCTGC	CTAACCGGCT	CAGTTCTGCG	TAGAAACCAA	CATGCAAGCT	CCACCGGGTG	CAAAGCGGCA
GCGGC							

6 Anhang

Transformationsvektor A260

GGCAGGATAT	ATTCAATTGT	AAATGGCTTC	ATGTCCGGGA	AATCTACATG	GATCAGCAAT	GAGTATGATG	GTCAATATGG
AGAAAAAGAA	AGAGTAATTA	CCAATTTTTT	TTCAATTCAA	AAATGTAGAT	GTCCGCAGCG	TTATTATAAA	ATGAAAGTAC
ATTTTGATAA	AACGACAAAT	TACGATCCGT	CGTATTTATA	GGCGAAAGCA	ATAAACAAAT	TATTTCTAAT	CGGAAATCTT
TATTTTCGAGC	TGTCTACATT	CACGTCCAAA	TGGGGGCTTA	GATGAGAAAC	TTCACGATCG	GCTCTAGAAC	ATGGTGGAGC
ACGACACTCT	CGTCTACTCC	AAGAATATCA	AAGATACAGT	CTCAGAAGAC	CAGAGGGCTA	TTGAGACTTT	TCAACAAAGG
GTAATATCGG	GAAACCTCCT	CGGATTCAT	TGCCCAGCTA	TCTGTCACTT	CATCGAAAGG	ACAGTAGAAA	AGGAAGATGG
CTTCTACAAA	TGCCATCATT	GCGATAAAGG	AAAGGCTATC	GTTCAGATG	CCTCTACCGA	CAGTGGTCCC	AAAGATGGAC
CCCCACCCAC	GAGGAACATC	GTGGAAAAAG	AAGACGTTCC	AACCACGTCT	TCAAAGCAAG	TGGATTGATG	TGATATCTCC
ACTGACGTAA	GGGATGACGC	ACAATCCCAC	TATCCTTCGC	AAGACCCCTC	CTCTATATAA	GGAAGTTCAT	TTCATTTGGA
GAGGACCTCG	AGTGGCCACC	ATGGGCGCCT	GGATTGAACA	AGATGGATTG	CACGCAGGTA	AGTTTCTGCT	TCTACCTTTG
ATATATATAT	AATAATTATC	ATTAATTAGT	AGTAATATAA	TATTTCAAAT	ATTTTTTTCA	AAATAAAAAG	ATGTAGTATA
TAGCAATTGC	TTTTCTGTAG	TTTATAAGTG	TGTATATTTT	AATTTATAAC	TTTTCTAATA	TATGACCAA	ATTTGTTGAT
GTGCAGGTTT	TCCGGCCGCT	TGGGTGGAGA	GGCTATTCCG	CTATGACTGG	GCACAACAGA	CAATCGGCTG	CTCTGATGCC
GCCGTGTTCC	GGCTGTCAGC	GCAGGGGCGC	CCGTTCTTTT	TTGTCAAGAC	CGACCTGTCC	GGTGCCTGA	ATGAAGTGA
GGACGAGGCA	GCGCGGCTAT	CGTGCTGGC	CACGACGGGC	GTTCCTTGGC	CAGCTGTGCT	CGACGTTGTC	ACTGAAGCGG
GAAGGGACTG	GCTGCTATTG	GGCGAAGTGC	CGGGCAGGA	TCTCCTGTCA	TCTCACCTTG	CTCCTGCCGA	GAAAGTATCC
ATCATGGCTG	ATGCAATGCG	GCGGCTGCAT	ACGCTTGATC	CGGCTACCTG	CCCATTGCAC	CACCAAGCGA	AACATCGCAT
CGAGCGAGCA	CGTACTCGGA	TGGAAGCCGG	TCTTGTCGAT	CAGGATGATC	TGGACGAAGA	GCATCAGGGG	CTCGCGCCAG
CCGAACGTGT	CGCCAGGCTC	AAGGCGCGCA	TGCCCGACGG	CGAGGATCTC	GTCGTGACCC	ATGGCGATGC	CTGCTTGCCG
AATATCATGG	TGGAAAATGG	CCGCTTTTCT	GGATTCATCG	ACTGTGGCCG	GCTGGGTGTG	GCGGACCGCT	ATCAGGACAT
AGCGTTGGCT	ACCCGTGATA	TTGCTGAAGA	GCTTGCGCGC	GAATGGGCTG	ACCGCTTCCT	CGTGTCTTAC	GGTATCGCCG
CTCCCATTC	GCAGCGCATC	GCCTTCTATC	GCCTTCTTGA	CGAGTCTTTC	TGAACGCGTT	CGAGTATTAT	GGCATTGGGA
AAACTGTTTT	TCTTGACCA	TTTGTGTGTC	TTGTAATTTA	CTGTGTTTTT	TATTCGGTTT	TCGCTATCGA	ACTGTGAAAT
GGAAATGGAT	GGAGAAGAGT	TAATGAATGA	TATGGTCCTT	TTGTTTCATTC	TCAAATTAAT	ATTATTTGTT	TTTTCTCTTA
TTTGTGTGTG	GTTGAATTTG	AAATATAAAG	AGATATGCAA	ACATTTTGTG	TTGAGTAAAA	ATGTGTCAAA	TCGTGGCCTC
TAATGACCGA	AGTTAATATG	AGGAGTAAAA	CACTGAAGCC	TGCAGGCATG	CAAGCTGATC	CACTAGAGGC	CATGGCGGCC
GCACTAGATC	AACATGGTGG	AGCAGGACAC	TCTCGTCTAC	TCCAAGAATA	TCAAAGATAC	AGTCTCAGAA	GACCAGAGGG
CTATTGAGAC	TTTTCAACAA	AGGGTAATAT	CGGGAAACCT	CCTCGGATTC	CATTGCCCAG	CTATCTGTCA	CTTCATCGAA
AGGACAGTAG	AAAAGGAAGA	TGGCTTCTAC	AAATGCCATC	ATTGCGATAA	AGGAAAGGCT	ATCGTTCAAG	ATGCCCTCTAC
CGACAGTGGT	CCCAAAGATG	GACCCCCACC	CACGAGGAAC	ATCGTGGA	AAGAAGACGT	TCCAACCACG	TCTTCAAAGC
AAGTGGATTG	ATGTGATATC	TCCACTGACG	TAAGGGATGA	CGCACAATCC	CACTATCCTT	CGCAAGACCC	TTCCTCTATA
TAAGGAAGTT	CATTTCAATTT	GGAGAGGACA	CTAGTTGGAT	CCTCCATAAC	TATGGCCCC	AAGAAGAAGC	GCAAAGTGGG
AATCCACGGA	GCTCCAGACA	AGAAGTACAG	CATTGGTCTG	GACATCGGGA	CCAACCCGT	CGGCTGGGCC	GTTATCACCG
ATGAGTACAA	AGTGCCTTCT	AAGAAGTTCA	AAGTCCCTCG	AAACACTGAC	AGGCACAGCA	TCAAGAAGAA	CTTGATTGGC
GCCCTTCTCT	TCGACTCCGG	CGAAACCGCT	GAGGCCACCC	GTCTGAAGCG	CACCGCCAGA	AGGCGCTACA	CCCGTCGCAA
GAATAGGATC	TGCTACCTCC	AGGAGATCTT	CAGCAACGAG	ATGGCCAAAG	TGGACGATTC	CTTCTTTCAC	CGTTTGGAGG
AGAGCTTCCT	TGTCGAGGAG	GACAAGAAGC	ACGAGCGCCA	TCCCATCTTC	GGAAACATTG	TTGACGAGGT	GGCTTACCAC
GAGAAGTATC	CAACTATCTA	CCACCTCAGA	AAGAAGCTGG	TGGACTCCAC	CGACAAGGCC	GATTTGAGGC	TCATCTACCT
TGCCCTCGCT	CACATGATCA	AGTTCCGCGG	TCATTCCTG	ATTGAGGGCG	ACCTCAACCC	CGACAACCTC	GACGTCGATA
AGTTGTTTCT	CCAACCTGGT	CAGACCTACA	ACCAGCTTTT	CGAGGAGAA	CCTATCAACG	CCTCCGGGGT	TGACGCCAAG
GCTATTCTCA	GCGCCCGTCT	GTCCAAGAGC	CGCAGGCTTG	AGAACTTGAT	CGCCAGCTC	CCAGGAGAGA	AGAAGAACGG
CCTCTTCGGA	AACCTGATCG	CTCTCTCCTT	GGGCCTTACC	CCTAACTTCA	AGTCTAATTT	TGACCTCGCC	GAGGACGCCA
AGCTGCAACT	CAGCAAGGAC	ACCTACGATG	ACGACTTGG	CAACCTGCTC	GCCCAGATCG	GCGATCAGTA	CGCTGACCTT
TTCTTGGCCG	CCAAGAACCT	CTCCGACGCT	ATTCTGCTCT	CCGACATCCT	TCGCGTGAAC	ACTGAGATCA	CCAAGGCCCC
ACTGAGCGCC	TCCATGATCA	AGCGTTACGA	CGAACACCAC	CAAGATTTGA	CCCTCTCAA	GGCTCTTGTC	AGACAGCAGC
TGCCCGAGAA	GTACAAGGAG	ATTTTCTTCG	ACCAGAGCAA	GAACGGATAC	GCCGGTTACA	TCGACGGCGG	GGCCTCCCAA
GAGGAGTTCT	ACAAGTTCAT	CAAGCCCATC	TTGGAGAAGA	TGGACGGCAC	CGAAGAGCTG	CTCGTGAAGC	TCAACCGCGA
GGATCTTTTG	AGGAAGCAGC	GTACCTTCGA	CAACGGATCT	ATTCCCCACC	AGATCCATCT	CGGCGAGCTG	CACGCTATCC
TCCGCAGGCA	AGAGGACTTC	TATCCATTCC	TTAAGGACAA	TCGCGAGAAG	ATTGAAAAGA	TCCTCACTTT	TAGAATCCCT
TACTACGTCG	GACCCTTGGC	CCGTGGCAAC	AGCCGCTTCG	CCTGGATGAC	CAGGAAGTCC	GAGGAAACCA	TCACCCCATG
GAACCTTCGAG	GAGGTGGTTG	ACAAGGGGGC	CAGCGCTCAG	TCCTTCATTTG	AGCGCATGAC	CAACTTCGAT	AAGAACCTGC

6 Anhang

CCAACGAGAA	AGTCTCCCA	AAGCACTCCC	TTCTGTACGA	GTACTTCACT	GTCTACAATG	AGTTGACCAA	AGTGAAGTAC
GTGACCGAGG	GTATGCGTAA	GCCTGCCTTC	CTCAGCGGCG	AGCAGAAGAA	GGCCATCGTT	GACCTCCTGT	TCAAGACCAA
CAGGAAAGTC	ACCGTGAAGC	AGCTTAAGGA	GGACTACTTC	AAGAAGATCG	AGTGCITTGA	CTCTGTGCGAG	ATCAGCGGAG
TGGAGGATCG	CTTCAACGCT	TCCTTGGGCA	CTTACCACGA	CCTCCTGAAG	ATTATCAAGG	ACAAGGACTT	CCTCGACAAC
GAGGAGAACG	AAGATATCTT	GGAGGACATC	GTTCTTACCC	TCACCCTGTT	CGAGGACAGA	GAGATGATTG	AGGAACGCTT
CAAGACCTAC	GCCCACTTGT	TCGACGATAA	AGTCATGAAG	CAACTTAAGC	GTAGGCGCTA	CACCGGATGG	GGCAGGCTGT
CCCCTAAGCT	CATCAACGGT	ATCCGCGACA	AGCAGAGCGG	CAAGACTATT	CTCGACTTCT	TGAAGTCCGA	CGGATTCGCC
AATCGCAACT	TCATGCAGCT	GATCCACGAC	GATTCTCTTA	CCTTCAAGGA	GGACATCCAA	AAGGTCTAAG	TGTCCGGCCA
GGCGGACAGC	CTCCACGAGC	ACATCGCCAA	CCTGGCCGGG	AGCCCCGCTA	TTAAGAAGGG	AATCTCCAG	ACCGTCAAGG
TGGTTGACGA	GTTGGTCAAG	GTGATGGGCA	GACATAAGCC	AGAGAACATC	GTCATCGAGA	TGGCCAGGGA	AAACCAGACC
ACCCAGAAGG	GACAGAAGAA	CTCCCGTGAG	CGCATGAAGA	GGATTGAGGA	GGGCATCAAG	GAGCTTGGTT	CCCAGATCCT
CAAGGAGCAC	CCCCTGGAAA	ACACCCAACT	CCAGAATGAG	AAGCTGTATT	TGTACTACCT	TCAGAACGGG	CGCGATATGT
ACGTTGACCA	AGAGCTGGAC	ATCAACCGCC	TCAGCGACTA	CGACGTGGAT	CACATTGTCC	CTCAGTCCCT	TCTCAAGGAC
GACTCTATCG	ACAACAAGGT	GTTGACTAGA	AGCGATAAGA	ACCGCGCAA	GTCCGACAAC	GTCCCATCCG	AGGAGGTGGT
CAAGAAGATG	AAGAATTACT	GGAGGCAGCT	GCTTAACGCC	AAGCTCATCA	CCCAGCGCAA	GTTGACAAC	TTGACCAAGG
CCGAGCGTGG	AGGCCTCAGC	GAACTGGACA	AGGCTGGATT	CATCAAGAGG	CAACTTGTTG	AAACCCGCCA	GATTACCAAG
CACGTGGCCC	AGATCCTCGA	CTCCCGTATG	AACACTAAGT	ACGATGAGAA	CGACAAGCTG	ATCCGCGAGG	TCAAAGTGAT
TACCCTCAAG	AGCAAGCTCG	TGCTGACTT	CAGAAAGGAC	TTCCAATTCT	ACAAGGTTAG	GGAGATCAAC	AACTACCACC
ACGCCCACGA	TGCTTACCTT	AATGCCGTGG	TCGGCACCGC	CTTGATCAAG	AAGTACCCCA	AGCTGGAGTC	CGAGTTCGTG
TATGGTGACT	ACAAGGTCTA	CGACGTTCCG	AAGATGATCG	CTAAGAGCGA	GCAGGAGATT	GGCAAAGCCA	CCGCCAAGTA
CTTCTTCTAC	TCCAACATCA	TGAACTTCTT	TAAGACCGAG	ATCACTTTGG	CTAACGGGGA	GATCCGTAAG	CGCCCTCTCA
TTGAAACCAA	CGGAGAAACC	GGCGAGATCG	TGTGGGACAA	GGGCAGGGAC	TTCCGCCACG	TCAGAAAAGT	GCTGAGCATG
CCCCAAGTCA	ACATCGTGAA	GAAAACCGAG	GTTCAGACTG	GAGGCTTCTC	CAAGGAGTCT	ATCCTCCCAA	AGCGCAATTC
CGATAAGTTG	ATTGCCCGTA	AGAAGGACTG	GGACCCCAAG	AAGTACGGTG	GATTCGACAG	CCCAACCGTC	GCCTACTCCG
TGCTTGTCTG	GGCTAAAGTT	GAGAAGGGCA	AGAGCAAGAA	GCTCAAGTCC	GTCAAGGAGC	TGCTCGGGAT	CACCATCATG
GAGCGCAGCT	CCTTCGAGAA	GAACCTATT	GATTTCTTTG	AGGCCAAGGG	CTACAAGGAA	GTGAAGAAGG	ACTTGATCAT
CAAGCTCCCC	AAGTACTCTC	TGTTFCGAGCT	TGAGAACGGA	AGGAAGCGTA	TGCTCGCCTC	CGCTGGCGAG	CTGCAAAAAGG
GAAACGAGTT	GGCCCTCCCA	AGCAAGTACG	TCAACTTCTT	GTACCTCGCC	TCCCCTATG	AGAAGCTCAA	GGGCGACCCC
GAGGACAACG	AACAGAAGCA	GTTGTTTGTG	GAGCAGCATA	AGCACTACCT	TGACGAGATC	ATTGAGCAGA	TCAGCGAGTT
CTCCAAGCGC	GTTATCCTGG	CTGACGCCAA	TCTCGATAAA	GTCCTTTCTG	CCTACAACAA	GCACAGGGAC	AAGCCTATCA
GAGAGCAGGC	TGAAAACATT	ATCCACTTGT	TCACCCTCAC	CAACCTGGGT	GCCCCAGCCG	CCTTCAAGTA	CTTCGACACT
ACCATCGACC	GCAAGCGTTA	CACCTCCACC	AAGGAAGTGC	TCGATGCTAC	CCTTATCCAC	CAGAGCATT	CTGGGTTGTA
CGAAACCAGG	ATCGACCTGT	CCCAACTCGG	CGGAGACAAG	CGCCCCGCG	CCACCAAGAA	GGCTGGCCAG	GCCAAGAAGA
AGAAGTAACC	CGGGATCGTT	CAAACATTTG	GCAATAAAGT	TTCTTAAGAT	TGAATCTGT	TGCCGGTCTT	GCGATGATTA
TCATATAAAT	TCTGTTGAAT	TACGTTAAGC	ATGTAATAAT	TAACATGTAA	TGCATGACGT	TATTTATGAG	ATGGGTTTTT
ATGATTAGAG	TCCCGCAATT	ATACATTTAA	TACGCGATAG	AAAACAAAAT	ATAGCGCGCA	AACTAGGATA	AATTATCGCG
CGCGGTGTCA	TCTATGTTAC	TAGATCGCTC	GAATTCCTTC	GTTGAACAAC	GGAAACTCGA	CTTGCCCTCC	GCACAATACA
TCATTTCTTC	TTAGCTTTTT	TTCTTCTTCT	TCGTTTATAC	AGTTTTTTTT	TGTTTTATCAG	CTTACATTTT	CTTGAACCGT
AGCTTTCGTT	TTCTTCTTTT	TAACTTTCCA	TTCCGGAGTT	TTGTATCTTG	TTTCATAGTT	TGTCCAGGA	TTAGAATGAT
TAGGCATCGA	ACCTTCAAGA	ATTTGATTGA	ATAAAACATC	TTCATTCTTA	AGATATGAAG	ATAATCTTCA	AAAGGCCCTT
GGGAATCTGA	AAGAAGAGAA	GCAGGCCCAT	TTATATGGGA	AAGAACAATA	GTATTTCTTA	TATAGCCCA	TTTAAGTTGA
AAACAATCTT	CAAAAGTCCC	ACATCGCTTA	GATAAGAAAA	CGAAGCTGAG	TTTATATACA	GCTAGAGTCG	AAGTAGTGAT
TGCGAGAAAA	GGTCACCGAT	TGGTTTTAGA	GCTAGAAAAA	GCAAGTTAAA	ATAAGGCTAG	TCCGTTATCA	ACTTGAAAAA
GTGGCACCGA	GTCGGTGCTT	TTTTTTAGAC	CCAGCTTCTT	TGTACAAAGT	TGGCATTACG	CTCTTCGTTG	AACAACGGAA
ACTCGACTTG	CCTTCCGCAC	AATACATCAT	TTCTTCTTAG	CTTTTTTCTT	TCTTCTTCGT	TCATACAGTT	TTTTTTTGTT
TATCAGCTTA	CATTTTCTTG	AACCGTAGCT	TTCCGTTTCT	TCTTTTTAAC	TTTCCATTCG	GAGTTTTTGT	ATCTTGTTTC
ATAGTTTGTG	CCAGGATTAG	AATGATTAGG	CATCGAACCT	TCAAGAATTT	GATTGAATAA	AACATCTTCA	TTCTTAAGAT
ATGAAGATAA	TCTTCAAAAG	GCCCTGGGA	ATCTGAAAGA	AGAGAAGCAG	GCCCATTAT	ATGGGAAAGA	ACAATAGTAT
TTCTTATATA	GGCCCATTTA	AGTTGAAAAC	AATCTTCAAA	AGTCCACAT	CGCTTAGATA	AGAAAACGAA	GCTGAGTTTA
TATACAGCTA	GAGTCGAAGT	AGTGATTGTA	CTTGGTTTTG	ATATCATAGT	TTTAGAGCTA	GAAATAGCAA	GTTAAAATAA
GGCTAGTCCG	TTATCAACTT	GAAAAAGTGG	CACCGAGTCG	GTGCTTTTTT	TGTCGACAGG	CCTTAAGGGC	CAGATCTTGG
GCCCGGTACC	CGATCAGATT	GTCGTTTCCC	GCCTTCGGTT	TAAACTATCA	GTGTTTGACA	GGATATATTG	GCGGGTAAAC

6 Anhang

CTAAGAGAAA	AGAGCGTTTA	TTAGAATAAT	CGGATATTTA	AAAGGGCGTG	AAAAGGTTTA	TCCGTTCGTC	CATTTGTATG
TGCATGCCAA	CCACAGGGTT	CCCCTCGGGA	GTGCTTGCCA	TTCCGTGCGA	TAATGACTTC	TGTTCAACCA	CCCAAACGTC
GGAAAGCCTG	ACGACGGAGC	AGCATTCCAA	AAAGATCCCT	TGGCTCGTCT	GGGTCGGCTA	GAAGGTGCGAG	TGGGCTGCTG
TGGCTTGATC	CCTCAACGCG	GTGCGGGACG	TAGCGCAGCG	CCGAAAAATC	CTCGATCGCA	AATCCGACGC	TGTCGAAAAAG
CGTGATCTGC	TTGTGCTCT	TTGCGCCGAC	GTCTGGCCA	GTCAACACGC	GCCAAAGTTC	CGTCACAGGA	TGATCTGGCG
CGAGTTGCTG	GATCTGCTCT	TCAATCCGGG	TCTGTGGCGG	GAATCCACG	AAAATATCCG	AACGCAGCAA	GATATCGCGG
TGCATCTCGG	TCTTGCTTGG	GCAGTCGCCG	CCGACGCCGT	TGATGTGGAC	GCCGAAAAGG	ATCTAGGTGA	AGATCCTTTT
TGATAATCTC	ATGACCAAAA	TCCCTTAACG	TGAGTTTTTCG	TTCCACTGAG	CGTCAGACCC	CGTAGAAAAG	ATCAAAGGAT
CTTCTTGAGA	TCCTTTTTTTT	CTGCGCGTAA	TCTGCTGCTT	GCAAACAAAA	AAACCACCGC	TACCAGCGGT	GGTTTGTTTG
CCGGATCAAG	AGCTACCAAC	TCTTTTTCCG	AAGGTAACGT	GCTTCAGCAG	AGCGCAGATA	CCAAATACTG	TTCTTCTAGT
GTAGCCGTAG	TTAGGCCACC	ACTTCAAGAA	CTCTGTAGCA	CCGCCTACAT	ACCTCGCTCT	GCTAATCCTG	TTACCAGTGG
CTGCTGCCAG	TGGCGATAAG	TCGTGTCTTA	CCGGTTTGA	CTCAAGACGA	TAGTTACCGG	ATAAGGCGCA	GCGGTGCGGC
TGAACGGGGG	GTTCTGTCAC	ACAGCCAGC	TTGGAGCGAA	CGACCTACAC	CGAAGTGA	TACCTACAGC	GTGAGCTATG
AGAAAGCGCC	ACGCTTCCCG	AAGGGAGAAA	GGCGGACAGG	TATCCGTTAA	GCGGCAGGGT	CGGAACAGGA	GAGCGCACGA
GGGAGCTTCC	AGGGGGAAAC	GCCTGGTATC	TTTATAGTCC	TGTCGGGTTT	CGCCACCTCT	GACTTGAGCG	TCGATTTTTG
TGATGCTCGT	CAGGGGGGCG	GAGCCTATGG	AAAACGCCA	GCAACGCGGC	CTTTTTACGG	TTCCTGGCCT	TTTGTGCGCC
TTTTGCTCAC	ATGTTCTTTC	CTGCGTTATC	CCCTGATTCT	GTGGATAACC	GATTACCGCC	TTTGAGTGAG	CTGATACCGC
TCGCCGACG	CGAACGACCG	AGCGCAGCGA	GTCAGTGAC	GAGGAAGCGG	AAGAGCGCCT	GATGCGGTAT	TTTCTCCTTA
CGCATCTGTG	CGGTATTTCA	CACCGCATAT	GGTGCCTCT	CAGTACAATC	TGCTCTGATG	CCGCATAGTT	AAGCCAGTAA
CCGTGCGGCT	GCATGAAATC	CTGGCCGGTT	TGCTGATGC	CAAGCTCGCG	GCCTGGCCGG	CGAGCTTGGC	CGTGAAGAA
ACCGAGCGCC	GCCGTCTAAA	AAGGTGATGT	GTATTTGAGT	AAAACAGCTT	GCGTCATGCG	GTCGCTGCGT	ATATGATGCG
ATGAGTAAAT	AAACAAATAC	GCAAGGGGAA	CGCATGAAGG	TTATCGCTGT	ACTTAACCAG	AAAGGCGGGT	CAGGCAAGAC
GACCATCGCA	ACCCATCTAG	CCCGCGCCCT	GCAACTCGCC	GGGGCCGATG	TTCTGTTAGT	CGATTCCGAT	CCCCAGGGCA
GTGCCCGCGA	TTGGGCGGCC	GTGCGGGAAG	ATCAACCGCT	AACCGTTGTC	GGCATCGACC	GCCCAGCAT	TGACCGCGAC
GTGAAGGCCA	TCGGCCGGCG	CGACTTCGTA	GTGATCGACG	GAGCGCCCCA	GGCGGCGGAC	TTGGCTGTGT	CCGCGATCAA
GGCAGCCGAC	TTGCTGCTGA	TTCCGGTGCA	GCCAAGCCCT	TACGACATAT	GGGCCACCGC	CGACCTGGTG	GAGCTGGTTA
AGCAGCGCAT	TGAGGTACAG	GATGGAAGGC	TACAAGCGGC	CTTTGTGCTG	TCGCGGGCGA	TCAAAGGCAC	GCGCATCGGC
GGTGAGGTTG	CCGAGGCGCT	GGCCGGGTAC	GAGTGCCCA	TTCTTGAGTC	CCGTATCACG	CAGCGCGTGA	GCTACCCAGG
CACTGCCGCC	GCCGGCACAA	CCGTTCTTGA	ATCAGAACCC	GAGGGCGACG	CTGCCGCGA	GGTCCAGGCG	CTGGCCGCTG
AAATTAATC	AAAACCTCATT	TGAGTTAATG	AGGTAAAGAG	AAAATGAGCA	AAAGCACAAA	CACGCTAAGT	GCCGGCCGTC
CGAGCGCACG	CAGCAGCAAG	GCTGCAACGT	TGGCCAGCCT	GGCAGACACG	CCAGCCATGA	AGCGGGTCAA	CTTTCAGTTG
CCGGCGGAGG	ATCACACCAA	GCTGAAGATG	TACGCGGTAC	GCCAAGGCAA	GACCATTACC	GAGCTGCTAT	CTGAATACAT
CGCGCAGCTA	CCAGAGTAAA	TGAGCAAATG	AATAAATGAG	TAGATGAATT	TTAGCGGCTA	AAGGAGGCGG	CATGGAATAA
CAAGAACAAC	CAGGCACCGA	CGCCGTGGAA	TGCCCCATGT	GTGGAGGAAC	GGGCGGTTGG	CCAGGCGTAA	GCGGCTGGGT
TGCTGCGCGG	CCCTGCAATG	GCACTGGAAC	CCCCAAGCCC	GAGGAATCGG	CGTGAGCGGT	CGCAAACCAT	CCGGCCCGGT
ACAAATCGGC	GCGGGCCTGG	GTGATGACCT	GGTGGAGAAG	TTGAAGGCGG	CGCAGGCCGC	CCAGCGGCAA	CGCATCGAGG
CAGAAGCACG	CCCCGGTGAA	TCGTGGCAAG	CGGCCGCTGA	TCGAATCCGC	AAAGAATCCC	GGCAACCGCC	GGCAGCCGGT
GCGCCGTCGA	TTAGGAAGCC	GCCCAAGGGC	GACGAGCAAC	CAGATTTTTT	CGTTCCGATG	CTCTATGACG	TGGGCACCCG
CGATAGTCGC	AGCATCATGG	ACGTGGCCGT	TTTCCGTCTG	TCGAAGCGTG	ACCGACGAGC	TGGCGAGGTG	ATCCGCTACG
AGTTCACAGA	CGGGCACGTA	GAGGTTTCCG	CAGGGCCGGC	CGGCATGGCG	AGTGTGTGGG	ATTACGACCT	GGTACTGATG
GCGGTTTCCC	ATCTAACCGA	ATCCATGAAC	CGATACGGG	AAGGGAAGGG	AGACAAGCCC	GGCCGCGTGT	TCCGTCCACA
CGTTGCGGAC	GTAATCAAGT	TCTGCGGGC	AGCCGATGGC	GGAAAGCAGA	AAGACGACCT	GGTAGAAACC	TGCATTCGGT
TAAACACCAC	GCACGTTGCC	ATGCAGCGTA	CGAAGAAGGC	CAAGAACGGC	CGCCTGGTGA	CGGTATCCGA	GGGTGAAGCC
TTGATTAGCC	GCTACAAGAT	CGTAAAGAGC	GAAACCGGGC	GGCCGGAGTA	CATCGAGATC	GAGCTAGCTG	ATTGGATGTA
CCGCGAGATC	ACAGAAGGCA	AGAACCCGGA	CGTGCTGACG	GTTACCCCG	ATTACTTTTT	GATCGATCCC	GGCATCGGCC
GTTTTCTCTA	CCGCCTGGCA	CGCCGCGCCG	CAGGCAAGGC	AGAAGCCAGA	TGGTTGTTC	AGACGATCTA	CGAACGCAGT
GGCAGCGCCG	GAGAGTTCAA	GAAGTTCTGT	TTACCCGTGC	GCAAGCTGAT	CGGGTCAAAT	GACCTGCCGG	AGTACGATTT
GAAGGAGGAG	GCGGGGACAG	CTGGCCCGAT	CCTAGTCATG	CGCTACCGCA	ACCTGATCGA	GGGCGAAGCA	TCCGCCGGTT
CCTAATGTAC	GGAGCAGATG	CTAGGGCAAA	TTGCCCTAGC	AGGGGAAAAA	GGTCGAAAAG	GTCTCTTTCC	TGTGGATAGC
ACGTACATTT	GGAACCCAAA	GCCGTACATT	GGGAACCGGA	ACCCGTACAT	TGGGAACCCA	AAGCCGTACA	TTGGGAACCG
GTACACATG	TAAGTGACTG	ATATAAAAAGA	GAAAAAAGGC	GATTTTTCCG	CCTAAAACCTC	TTTAAAACCTT	ATTAATAACTC
TTAAAACCCG	CCTGGCCTGT	GCATAACTGT	CTGGCCAGCG	CACAGCCGAA	GAGCTGCAAA	AAGCGCCTAC	CCTTCGGTGC

6 Anhang

CTGCGCTCCC	TACGCCCGC	CGCTTCGCGT	CGGCCTATCG	CGGCCGCTGG	CCGCTCAAAA	ATGGCTGGCC	TACGGCCAGG
CAATCTACCA	GGGCGGGAC	AAGCCGCGCC	GTGCCACTC	GACCCCGGC	GCCCACATCA	AGGCACCGGT	GGTATGCCT
GACGATGCGT	GGAGACCGAA	ACCTTGCCT	CGTTCGCCAG	CCAGGACAGA	AATGCCTCGA	CTTCGCTGCT	GCCCAAGGTT
GCCGGGTGAC	GCACACCGTG	GAAACGGATG	AAGGCACGAA	CCCAGTGGAC	ATAAGCCTGT	TCGGTTCGTA	AGCTGTAATG
CAAGTAGCGT	ATGCGCTCAC	GCAACTGGTC	CAGAACCCTG	ACCGAACGCA	GCGGTGGTAA	CGGCCAGTG	GCGTTTTCA
TGGCTTGTTA	TGACTGTTTT	TTTGGGGTAC	AGTCTATGCC	TCGGGCATCC	AAGCAGCAAG	CGCGTTACGC	CGTGGGTCGA
TGTTTGATGT	TATGGAGCAG	CAACGATGTT	ACGCAGCAGG	GCAGTCGCC	TAAAACAAAG	TTAAACATCA	TGAGGGAAGC
GGTGATCGCC	GAAGTATCGA	CTCAACTATC	AGAGGTAGTT	GGCGTCATCG	AGCGCATCT	CGAACCGACG	TTGCTGGCCG
TACATTTGTA	CGGCTCCGCA	GTGGATGGCG	GCCTGAAGCC	ACACAGTGAT	ATTGATTTGC	TGGTTACGGT	GACCGTAAGG
CTTGATGAAA	CAACGCGGCG	AGCTTTGATC	AACGACCTTT	TGGAACTTC	GGCTTCCCCT	GGAGAGAGCG	AGATTCTCCG
CGCTGTAGAA	GTCACCATTG	TTGTGCACGA	CGACATCATT	CCGTGGCGTT	ATCCAGCTAA	GCGCGAACTG	CAATTTGGAG
AATGGCAGCG	CAATGACATT	CTTGACAGTA	TCTTCGAGCC	AGCCACGATC	GACATTGATC	TGGCTATCTT	GCTGACAAAA
GCAAGAGAAC	ATAGCGTTGC	CTTGGTAGGT	CCAGCGGCGG	AGGAACTCTT	TGATCCGGTT	CCTGAACAGG	ATCTATTTGA
GGCGCTAAAT	GAAACCTTAA	CGCTATGGAA	CTCGCCGCC	GACTGGGCTG	GCGATGAGCG	AAATGTAGTG	CTTACGTTGT
CCCGCATTTG	GTACAGCGCA	GTAACCGGCA	AAATCGCGCC	GAAGGATGTC	GCTGCCGACT	GGGCAATGGA	GCGCCTGCCG
GCCCAGTATC	AGCCCCTCAT	ACTTGAAGCT	AGACAGGCTT	ATCTTGACA	AGAAGAAGAT	CGCTTGGCCT	GCGCGCAGA
TCAGTTGGAA	GAATTTGTCC	ACTACGTGAA	AGGCGAGATC	ACCAAGGTAG	TCGGCAAATA	ATGTCTAACA	ATTCGTTCAA
GCCGACGCCG	CTTCGCGGCG	CGGCTTAAC	CAAGCGTTAG	ATGCACTAAG	CACATAATTG	CTCACAGCCA	AACTATCAGG
TCAAGTCTGC	TTTTATTATT	TTTAAGCGTG	CATAATAAGC	CCTACACAAA	TTGGGAGATA	TATCATGAAA	GGCTGGCTTT
TTCTTGTTAT	CGCAATAGTT	GGCGAAGTAA	TCGCAACATA	GCTTGCTTGG	TCGTTCCGCG	TGAACGTCGG	CTCGATTGTA
CCTGCGTTCA	AATACTTTGC	GATCGTGTTG	CGCGCCTGCC	CGGTGCGTCG	GCTGATCTCA	CGGATCGACT	GCTTCTCTCG
CAACGCCATC	CGACGGATGA	TGTTTAAAAG	TCCCATGTGG	ATCACTCCGT	TGCCCCGTCG	CTCACCGTGT	TGGGGGAAG
GTGCACATGG	CTCAGTTCTC	AATGGAAATT	ATCTGCCTAA	CCGGCTCAGT	TCTGCGTAGA	AACCAACATG	CAAGCTCCAC
CGGGTGAAA	GCGGCAGCGG						

6.3 Sequenzen und Strukturen der gRNAs

Die Sequenzen der verwendeten gRNAs die über T-DNA in den Kontroll-Klon P1eingebracht wurden sind nachstehend angegeben. Gelb unterlegt ist die gRNA-Sequenz; blau unterlegt der *Hairpin* und grün unterlegt die tracrRNA. In Abbildung 6.3 sind die unter Verwendung des Andronescu-Modells (Andronescu *et al.*, 2007) und des bioinformatischen *Tools RNA-fold* (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>; 27.04.2020, Gruber *et al.*, 2008) errechneten gRNA-Sekundärstrukturen angegeben. Die Darstellung erfolgte anhand der minimal aufgewendeten Energie (*minimum free energy*: MFE) unter Verwendung des Algorithmus von Zucker *et al.* (1981).

gRNA1

AGTTGATTTG GAAATAATGC TTTTAGAGCT AGAAATAGCA AGTTAAAAAT AGGCTAGTCC GTTATCAACT TGAAAAAGTG
GCACCGAGTC GGTGCTTTT TT

gRNA2

TTCTTCTCGA TTCCACATT GTTTTAGAGC TAGAAATAGC AAGTTAAAAAT AAGGCTAGTC CGTTATCAAC TTGAAAAAGT
GGCACCGAGT CGGTGCTTTT TTT

gRNA3

CGAGAAAAGG TCACCGATTG GTTTTAGAGC TAGAAATAGC AAGTTAAAAAT AAGGCTAGTC CGTTATCAAC TTGAAAAAGT
GGCACCGAGT CGGTGCTTTT TTT

gRNA4

TACTTGGTTT TGATATCATA GTTTTAGAGC TAGAAATAGC AAGTTAAAAAT AAGGCTAGTC CGTTATCAAC TTGAAAAAGT
GGCACCGAGT CGGTGCTTTT TTT

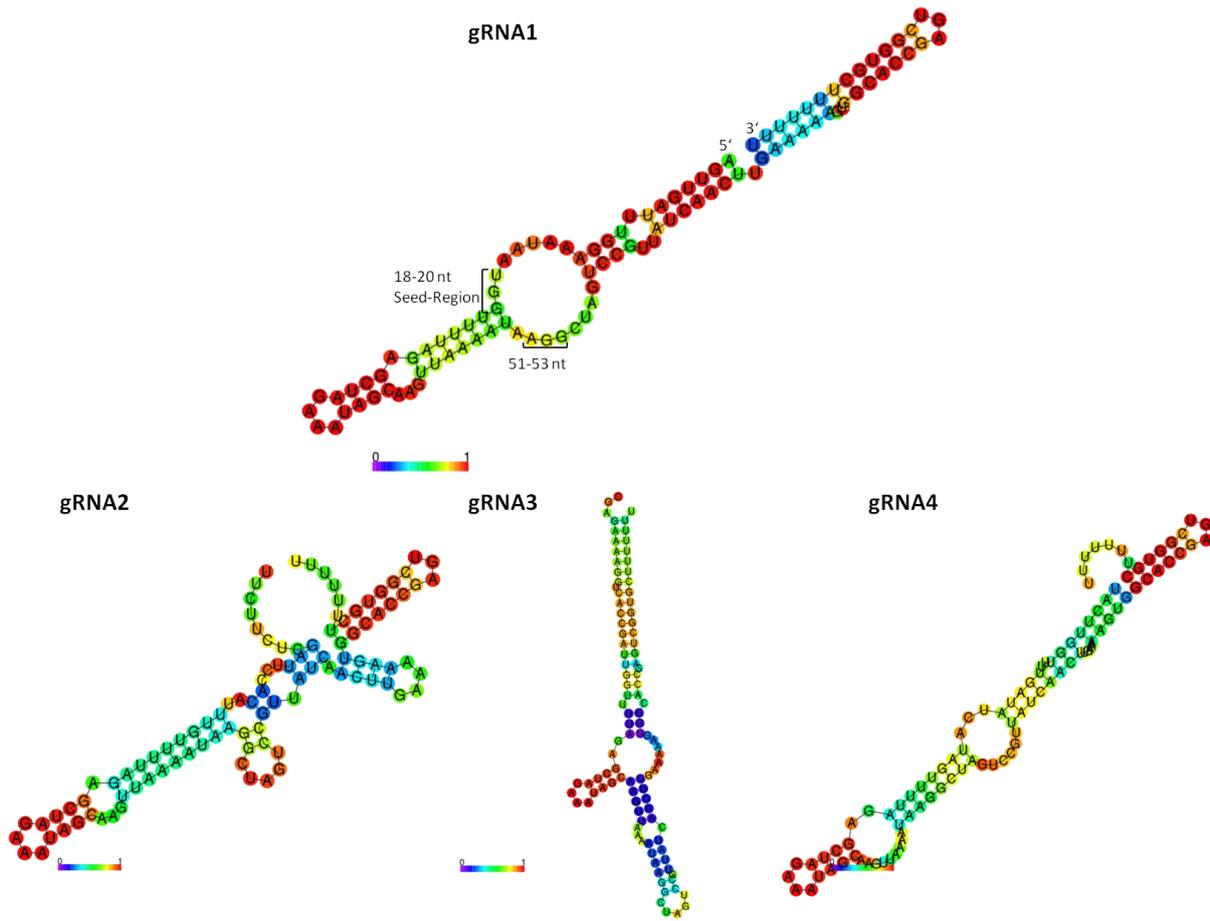


Abbildung 6.3: Sekundärstruktur der gRNAs zur CRISPR/Cas9-induzierten Modifikation der *NFP-like*-Kandidatengene

Dargestellt ist die Sekundärstruktur der verwendeten gRNAs. Die Berechnung der Sekundärstrukturen erfolgte mittels des bioinformatischen *Webtools RNA-fold* (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>; 27.04.2020, Gruber *et al.*, 2008) unter Verwendung des Andronescu-Modells (Andronescu *et al.*, 2007). Die Darstellung erfolgte anhand der minimal aufgewendeten Energie (*minimum free energy*: MFE) unter Verwendung des Algorithmus von Zucker *et al.* (1981). Targets: gRNA1 und gRNA2 zur Modifikation von *NFP-like1*; gRNA3 und gRNA4 zur Modifikation von *NFP-like3* und *NFP-like4*.

6.4 Oligonukleotide

Tabelle 6.2: Oligonukleotidliste

Angegeben ist die Nummerierung der verwendeten Oligonukleotide und deren Sequenz vom 5'-Ende zum 3'-Ende sowie deren Verwendung. Sofern nicht anders vermerkt wurden die Oligonukleotide in dieser Arbeit erzeugt. ¹ Thünen-Institut für Forstgenetik, Großhansdorf, Deutschland; ² Dr. Stephanie Werner, IPB Halle, Deutschland. F: *forward* in Leserichtung orientiertes Oligonukleotid; R: *reverse* entgegen der Leserichtung orientiertes Oligonukleotid.

Nummer	Sequenz 5' -> 3'	Verwendung
#308	AACAGACAATCGGCTGCTCTG	F: <i>NPTII</i> ¹
#309	ACGCTATGTCCTGATAGCGGT	R: <i>NPTII</i> ¹
#317	TTGAACAAGATGGATTGCACG	F: <i>NptII</i> ¹
#318	AAGAAGGCGATAGAAGGCGA	R: <i>NptII</i> ¹
#575	TGAGGCTTAGGGGAGGAACT	F: <i>UBIQUITIN</i> -ähnliches Referenzgen ¹
#576	CAACCCGTTCCCTTGATCCTA	R: <i>UBIQUITIN</i> -ähnliches Referenzgen ¹
#2090	TGTTACGCGAAGGATGTCG	R: Cas9 Funktionstest ¹
#2091	GAGAAGTTTGATAGCGTGTCTG	F: <i>hph</i> Funktionstest ¹
#2092	TAGCGTCACAGCGGCCTTG	R: <i>hph</i> Funktionstest ¹
#2233	CTTGGTCAATTTAGAGGAAGTAA	ITS1F (Gardes und Bruns, 1993)
#2234	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ITS4 (White <i>et al.</i> , 1990)
#2257	TTTCCACACAGGCTCTTCTTCTC	F: gRNA1 in <i>NFP-like1</i>
#2258	GTATTTGAAGGGCACTTACAGAAC	R: gRNA1 in <i>NFP-like1</i>
#2259	AAAATCAATGGCCGGTCTTGG	F: gRNA2 in <i>NFP-like1</i>
#2260	CTGTTTCCATCCCAGATGTCC	R: gRNA2 in <i>NFP-like1</i>
#2265	AATTTTAGCAAGAGTTCCTACTGAC	F: gRNA3 und gRNA4 in <i>NFP-like3</i> Intron
#2266	TCAAGCATCACCATCAGGTTCC	R: gRNA3 und gRNA4 in <i>NFP-like3</i> Intron
#2267	ACAAAACATTGCAAGGCAGAAAAG	F: gRNA3 und gRNA4 in <i>NFP-like3</i> Exon
#2268	CCCCTTACCAAGACCAGTAAAA	R: gRNA3 und gRNA4 in <i>NFP-like3</i> Exon
#2269	AGAAAGGCAGAACAACCAAG	F: gRNA3 und gRNA4 in <i>NFP-like4</i>
#2270	TATGTTATTGCCATTAGCATCCAC	R: gRNA3 und gRNA4 in <i>NFP-like4</i>
#2319	TTTACCTTGAAACCATAGACATC	F: gRNA3 und gRNA4 in <i>NFP-like3</i> Intron
#2320	CAGGTTCCAATTCTGTTAAC	R: gRNA3 und gRNA4 in <i>NFP-like3</i> Intron
#2324	AGCACAAGCTCCACCCGGC	F: gRNA1 in <i>NFP-like2</i>
#2325	GAAGCAGCTTATCCGGCTTGATC	R: gRNA1 in <i>NFP-like2</i>
#2326	GATCAAGCCGATAAGCTGCTTC	F: gRNA2 in <i>NFP-like2</i>
#2327	CCGTTTCCACCTCAGAAGTCCAC	R: gRNA2 in <i>NFP-like2</i>
#2330	CTCCTATGTCGAGTAGTTCGGGG	R: gRNA3 und gRNA4 in <i>NFP-like3</i> Exon
#2393	GACCTCATGTCTACTTATATT	F: Nachweis für <i>NFP-like2</i>
#2394	TTAAGCATAGCAGCTACTTTCT	R: Nachweis für <i>NFP-like2</i>
#2419	TCAAAAAGCCCCTGGGAATC	F: gRNA des Transformationsvektors
#2420	AAAAAAGCACCCGACTCGGTG	R: gRNA des Transformationsvektors
#2446	ACAGTAATATCCTCCACCATT	F: Seq <i>NFP-like3</i> Exon
#2447	AGTGTTCGCTGCCTCGATGGT	R: Seq. <i>NFP-like3</i> Exon
#2448	CTATTACAGTACTATCCTCCA	F: Seq. <i>NFP-like4</i>
#2449	AAGTATTCAGTTGAGACAAGG	R: Seq. <i>NFP-like4</i>
#2540	ATCTTCAGCAACGAGATGGC	F: Cas9 Sonde
#2560	TTCAGCTTTGATGTTGGCGG	F: <i>Hph</i> Sonde_A259
#2561	AATCGCCAAACATAGCTTCG	R: <i>Hph</i> Sonde_A259

Fortsetzung Tabelle 6.2:

#2562	AAGTCTCAATAGCCCTCTGG	R: Tail I
#2563	AAGTTTCTCATCTAAGCCCCC	R: Tail II
#2564	TAACGCTGCGGACATCTAC	R: Tail III
#2571	AATCCTCGGCCCAACATG	R: <i>Hph</i> Sonde_A259 ohne Intron
#2584	AGATTTCCCGGACATGAAGC	R: TAIL Seq.
#2586	TTCGATAATAAGTAGCCTAATAGTG	F: NAD6 (Ville <i>et al.</i> , 2013)
#2587	AAATACAATAGGGCCAATCAT	R: NAD6 (Ville <i>et al.</i> , 2013)
#2588	TTGCTCTTCAACGAGGAAT	F: FUN18SF (Pitkäranta <i>et al.</i> , 2008)
#2589	TCAACAGACTTGTACATGGTCC	R: ITS4BR (Vialle <i>et al.</i> , 2009)
#2609	TCTTGCTGATTACAACATCCAG	F: cDNA Nachweis P1
#2610	AACCACCCCTCAGAGCAAG	R: cDNA Nachweis Check P1
#2677	AGAACTAAAGATTTTGCAGAAAG	F: gRNA2 in <i>NFP-like1</i>
#2678	CTGTTTCCATCCCAGATGT	R: gRNA2 in <i>NFP-like1</i>
#2679	TTACAGTAATATCCTCCACC	F: <i>NFP-like3</i> cDNA
#2681	GATGGTATATGTGATGTTTG	R: gRNA3 und gRNA4 in <i>NFP-like3</i> Exon
#2682	AACAACCAAGCCAAAAATGAC	F: gRNA3 und gRNA4 in <i>NFP-like4</i>
#2683	ATGATAAGTTATCAGAAGGC	R: gRNA3 und gRNA4 in <i>NFP-like4</i>
#2689	CTCTCGCGCAGGATTTGTAG	F: OFF-Target gRNA1 Alba-Allel
#2690	AGCAGTGCACCTTCTCCTGT	R: OFF-Target gRNA1 Alba-Allel
#2691	AAATCCCTAATCCCCTTCTC	F: OFF-Target gRNA2
#2692	AATACATCAACTTTAGGCATC	R: OFF-Target gRNA2
#2699	GGGTCTCCTCTAGTTGAAGATTC	F: OFF-Target gRNA4 Tremula-Allel
#2700	AGTATTTGGGCTCACACTTG	R: OFF-Target gRNA4 Tremula-Allel
#2701	GGGTCTCCTTCAGTTGAAGATTC	F: OFF-Target gRNA4 Alba-Allel
#2702	AGAATTTGGGCTTGCACCTTG	R: OFF-Target gRNA4 Alba-Allel
#2721	CCTCCACCTATGTCACCTC	F: <i>NFP-like 1</i> gRNA1 Alba-Allel
#2722	ACACAGTTGTTCTCAATCAC	R: <i>NFP-like 1</i> gRNA1 Alba-Allel
#2723	GTCCACCCATGTCTCCTTA	F: <i>NFP-like 1</i> gRNA1 Tremula-Allel
#2725	TAGTGCTATTGATGATGGGG	R: Seq <i>NFP-like3</i> Tremula-Allel
#2726	TGTTAGTGCTATTGATGGGG	R: Seq <i>NFP-like3</i> Alba-Allel
#2727	ATGGCAATATCTTTGCTCCC	F: <i>NFP-like1</i> gRNA1 Tremula- und Alba-Allel
#2728	TTGCAGCAACAATGATGATCC	R: <i>NFP-like1</i> gRNA1 Tremula- und Alba-Allel
#2749	CTGGTAGGTAGTAAGGTTTCC	R: Seq <i>NFP-like 4</i> Tremula- und Alba-Allel
#2750	AGTTTCTGTTTCGAATCTGAAAC	F: <i>NFP-like3</i> Intron Fragment Tremula- und Alba-Allel
#2751	TTTATCATTTGAGTCTCTAGC	R: <i>NFP-like3</i> Intron Fragment Tremula- und Alba-Allel
#2752	AAAAGTAGTTTCTGGAAAACC	F: <i>NFP-like3</i> Exon Fragment Tremula- und Alba-Allel
#2753	AAAGGCTGGAGTATATACTG	R: <i>NFP-like3</i> Exon Fragment Tremula- und Alba-Allel
#2771	TAGTGGTTTTCAATCACAATGT	R: <i>NFP-like1</i> gRNA1 Tremula-Allel
#2773	CACCTGCCAGCCAACCA	F: Seq <i>NFP-like 3</i>
#2774	TGCAAGAACATGATAAAGGGAC	R: Seq <i>NFP-like3</i>
#2814	CATATACCATCGAGGCAGGCA	F: qPCR <i>NFP-like3</i> ²
#2815	TCGGGGATAAGTGTAGGGTTGAA	R: qPCR <i>NFP-like3</i> ²
#2819	ATGAAAGTCATACACCGGTCACC	R: <i>NFP-like4</i> Intron

6 Anhang

Fortsetzung Tabelle 6.2:

#2825	GGTTTTTCCTTCTTTGGCGCCTT	F: <i>NFP-like4</i> Exon
#2839	CCGTATAATGCCATTTTGTACC	F: qPCR <i>NFP-like4</i>
#2840	CATTATAGGGTTCCAAATCCAGA	R: qPCR <i>NFP-like4</i>
#2845	AATTTCTTGGACCTCGGAAA	F: qPCR <i>NFP-like1</i>
#2846	AGACTCCAGGTTGCTTGCAG	R: qPCR <i>NFP-like1</i>
#3016	TTTTTCTCCGGCTGTTCTTAG	F: OFF-Target gRNA1 Tremula-Allel
#3017	AATTCTGTTTGAATTGCGTC	R: OFF-Target gRNA1 Tremula-Allel
#3073	CAAGCCAAAAATGACAGCC	F: <i>NFP-like3</i> intergenisch Tremula-Allel
#3074	TTGGTTTTGATATCATAAGGCG	R: <i>NFP-like3</i> intergenisch Tremula-Allel

6.5 Proteinvorhersage von *NFP-like3* in N482-24

Tabelle 6.3: Auswirkung der durch CRISPR/Cas9 erzeugten Modifikation auf die Proteinstruktur von *NFP-like3* in N482-24

Dargestellt sind die Modifikationen für beide Allele der Linie N482-47. g3: gRNA3-Target; g4: gRNA4-Target; AS: Aminosäure; nt: Nukleotide; GP: Gesamtprotein; Vorzeitiges Stopcodon: Stopcodon auf dem eigentlichen Leseraster des Proteins; grün: Transkriptvariante 1; ohne Färbung: Transkriptvariante 2.

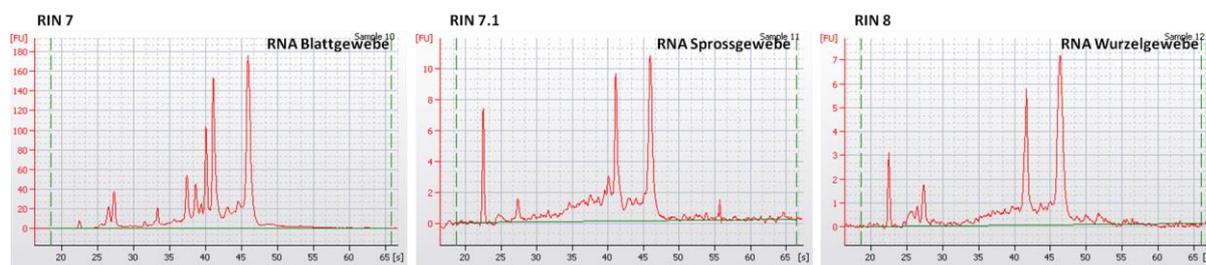
Modifikation	Anmerkung
Alba/ Tremula g3: Insertion T g4: Wt	Stopcodon bei AS 64 \cong 10,3 % des GP Verkürzte Version mit 576/577 AS auf anderem Leseraster erzeugt Protein ohne Signalpeptid: Alba \cong 92,6 % des GP Tremula \cong 92,3 % des GP
Alba/ Tremula g3: Wt g4: Insertion A	Stopcodon bei AS 78 \cong 12,5 % des GP Verkürzte Version mit 576/577 AS auf anderem Leseraster erzeugt Protein ohne Signalpeptid: Alba \cong 92,6 % des GP Tremula \cong 92,3 % des GP
Alba/ Tremula g3: Insertion T g4: Insertion A	Stopcodon bei AS 64 \cong 10,3 % des GP Verkürzte Version mit 326 AS auf einem anderen Leseraster erzeugt nur die Kinase: Alba \cong 52,4 % des GP Tremula \cong 52,3 % des GP
Alba/ Tremula g3: Insertion A g4: Wt	Stopcodon bei AS 64 \cong 10,3 % des GP Verkürzte Version mit 576/577 AS auf anderem Leseraster erzeugt Protein ohne Signalpeptid: Alba \cong 92,6 % des GP Tremula \cong 92,3 % des GP
Alba/ Tremula g3: Insertion A g4: Insertion A	Stopcodon bei AS 64 \cong 10,3 % des GP Verkürzte Version mit 326 AS auf einem anderen Leseraster erzeugt nur die Kinase: Alba \cong 52,4 % des GP Tremula \cong 52,3 % des GP
Alba/ Tremula g3: Insertion TT g4: Wt	Stopcodon bei AS 73 \cong 11,7 % des GP Verkürzte Version mit 550/ 551 AS auf anderem Leseraster erzeugt Protein ohne Signalpeptid: Alba \cong 88,3 % Tremula \cong 88,4 %
Alba/ Tremula g3: Insertion TT g4: Insertion A	Erzeugt ein funktionales Protein
Alba/ Tremula g3: Insertion T g4: Wt	Stopcodon vor Startcodon Vorzeitiges Startcodon, erzeugt ein Protein mit einer Gesamtlänge von 576/577 AS. Längere Version der Transkriptvariante 2 ohne Signalpeptid
Alba/ Tremula g3: Wt g4: Insertion A	Stopcodon vor Startcodon Vorzeitiges Startcodon, erzeugt ein Protein mit einer Gesamtlänge von 576/577 AS. Längere Version der Transkriptvariante 2 ohne Signalpeptid
Alba/ Tremula g3: Insertion T g4: Insertion A	Stopcodon vor Startcodon Verkürzte Version mit 326 AS, auf einem anderen Leseraster erzeugt nur die Kinase Alba \cong 59,3 % des GP Tremula \cong 59,2 % des GP

Fortsetzung Tabelle 6.3

Alba/ Tremula g3: Insertion A g4: Wt	Stopcodon vor Startcodon Vorzeitiges Startcodon, erzeugt ein Protein mit einer Gesamtlänge von 576/577 AS. Längere Version der Transkriptvariante2 ohne Signalpeptid
Alba/ Tremula g3: Insertion A g4: Insertion A	Stopcodon vor Startcodon Verkürzte Version mit 326 AS, auf einem anderen Leseraster erzeugt nur die Kinase Alba \cong 59,3 % des GP Tremula \cong 59,2 % des GP
Alba/ Tremula g3: Insertion TT g4: Wt	Verkürzte Version mit 550/ 551 AS auf einem anderen Leseraster Alba \cong 99,8 % des GP Tremula \cong 99,8 % des GP
Alba/ Tremula g3: Insertion TT g4: Insertion A	Verkürzte Version mit 326 AS, auf einem anderen Leseraster erzeugt nur die Kinase Alba \cong 59,3 % des GP Tremula \cong 59,2 % des GP

6.6 Messung der Integrität der RNA

Zur Bestimmung des Degradationsgrades der isolierten RNA aus Blatt-, Spross- und Wurzelgewebe erfolgten Messungen am Bioanalyser (Aligent 2100, Aligent Technologies, Santa Clara, USA). In Abbildung 7.4 sind die Elektropherogramme der analysierten RNA-Proben dargestellt.

**Abbildung 6.4: Elektropherogramme der RNA aus Blatt-, Spross- und Wurzelgewebe**

Dargestellt sind beispielhaft die Elektropherogramme ausgewählter in der Real-Time-PCR verwendeten RNA-Proben. Die Messung der Fluoreszenz (FU) in Abhängigkeit der Zeit (s) erfolgte nach Aufschluss der RNA am Bioanalyser Aligent 2100 (Aligent Technologies, Santa Clara, USA). RIN-Wert der RNA aus Blattgewebe: 7; RIN-Wert der RNA aus Sprossgewebe 7.1; RIN-Wert aus Wurzel-Gewebe: 8.

6.7 Boxplots der erhobenen Daten des Mykorrhizierungsversuches

Zur Veranschaulichung der Datenverteilung wurden die erhobenen Messwerte zur Höhe, des Durchmessers, der Blattanzahl sowie des Frisch- und Trockengewichtes der untersuchten transgenen Linien N481-97, N483-8 und des Kontroll-Klones P1 in Abbildung 6.5 als Boxplots dargestellt. Die Darstellung erfolgte unter Verwendung von RStudio mittels des Grafikpakets ggPlot (Wickham, 2009).

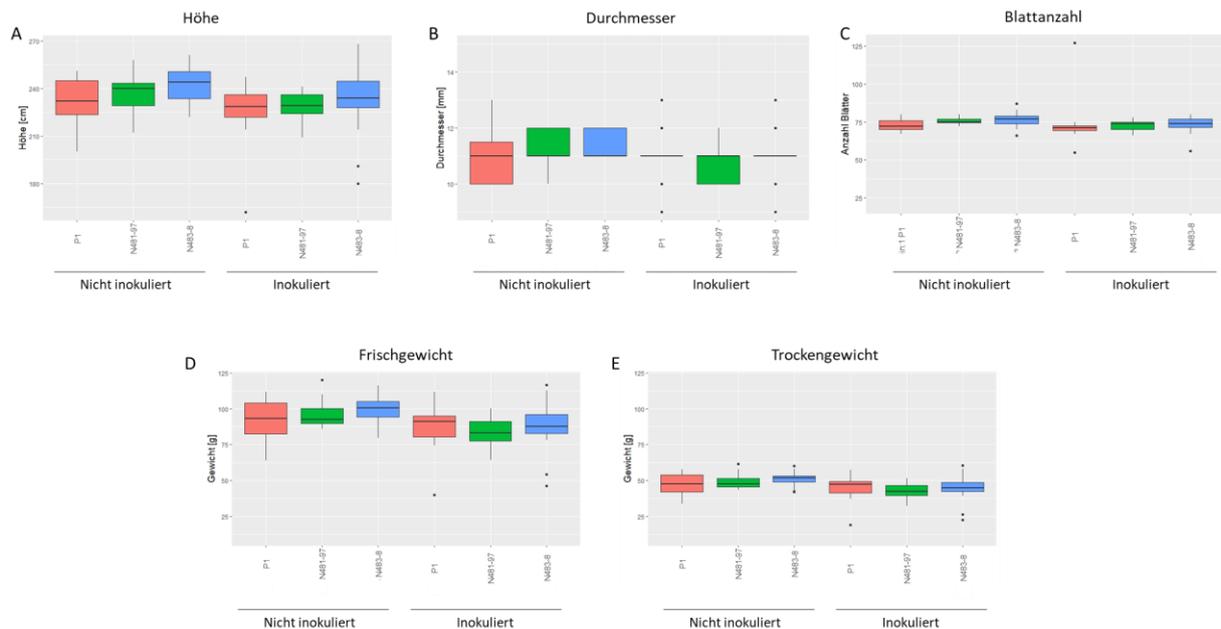


Abbildung 6.5: Phänotypische Analyse der inokulierten und nicht-inokulierten Linien

Grafische Darstellung der erhobenen Daten inokulierter und nicht-inokulierter Linien in Bezug auf Höhe, Durchmesser, Blattanzahl, Frisch- und Trockengewicht nach sechs Monaten Wachstum unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus. A: Boxplot zur Höhe; B: Boxplot zum Durchmesser, C: Boxplot zur Blattanzahl, D: Boxplot zum Frischgewicht; E: Boxplot zum Trockengewicht.

6.8 Auswertung der Infektionsversuche mit *Melampsora spec.*

6.8.1 Testung verschiedener Pappelklone

Zur Testung einer Anfälligkeit oder Resistenz gegenüber *Melampsora spec.* wurden 20 Pappelklone aus drei Sektionen für die Infektionsversuche eingesetzt. In Tabelle 6.5 und 6.6 sind die Quantile und der Median zu den Boniturzeitpunkten 7, 14 und 21 Tage nach Inokulation für die zwei verwendeten *Melampsora*-Stämme angegeben. In Tabelle 6.4 sind die Werte für die Inokulation für *Melampsora larici-populina* und in Tabelle 6.5 die Werte für die Inokulation mit *Melampsora larici-tremulae* angegeben. Weiterhin sind die Mittelwerte und die Standardabweichung (SD) für die Inokulation mit *Melampsora larici-populina* in Tabelle 6.6 und für die Inokulation mit *Melampsora larici-tremulae* in Tabelle 6.7 für alle Boniturzeitpunkte angegeben.

Tabelle 6.4: Werte der Quantile der Kloninfektion mit *Melampsora larici-populina*.

Angegeben sind die Quantile und der Median der erhobenen Daten zu den Boniturzeitpunkten dpi7, dpi14 und dpi21= 7, 14 und 21 Tage nach Inokulation in Abhängigkeit der inokulierten Klone. Q₂₅=25 % Quantil Q₇₅=75 % Quantil.

Klon	dpi7			dpi14			dpi21		
	Q ₂₅	Median	Q ₇₅	Q ₂₅	Median	Q ₇₅	Q ₂₅	Median	Q ₇₅
Aue2	0	0	1	1	3	15	1	4	23,75
P7	0	2	15	1	20	30	1,5	20	30
Max1	0	0	0	1	3	10	1	12,5	21,25
Rochester	1	1	3	5	10	15	10	20	25
Astria	0	0	0	0	1	1	0	1	1
Brauna11	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T89	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Androscoggin	1	1	1	5	15	20	10	20	25
Muhle Larsen	0	0	0	0	1	5	0	3	10
Nisqually	1	3	5	5	10	15	10	20	25
Weser4	0	0	1	1	3	5	1	3	7,5
Weser6	1	1	3	5	10	10	10	15	20

Tabelle 6.5: Werte der Quantile der Kloninfektion mit *Melampsora larici-tremulae*.

Angegeben sind die Quantile und Median der erhobenen Daten zu den Boniturzeitpunkten dpi7, dpi14 und dpi21= 7, 14 und 21 Tage nach Inokulation in Abhängigkeit der inokulierten Klone. Q₂₅=25 % Quantil Q₇₅=75 % Quantil.

Klon	dpi7			dpi14			dpi21		
	Q ₂₅	Median	Q ₇₅	Q ₂₅	Median	Q ₇₅	Q ₂₅	Median	Q ₇₅
DN5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P7	0	0	0	0	0	5	0	0	5
4x Göttingen	0	0	0	1	1	4	1	1	4
Astria	0	0	0	1	1	5	1	3	10
Brauna11	0	0	0	0	0	1	0	0	2,5
Esch5	0	0	0	1	1	3	1	3	4,5
P1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T89	0	0	0	0	1	3	0	1	5
Villafranca	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W52	0	0	1	0	3	5	1	5	15

Tabelle 6.6: Mittelwerte mit Standardabweichung der infizierten Blattfläche durch *Melampsora larici-populina*

Tabellarisch dargestellt sind die gegenüber *Melampsora larici-populina* anfälligen Pappelklone mit dem Mittelwert (M) und der Standardabweichung (SD) berechnet nach der iterativ in Prozent abgeschätzten infizierten Blattfläche in Abhängigkeit von den drei Boniturzeitpunkten dpi7, dpi14 und dpi21= 7, 14 und 21 Tage nach Inokulation in Abhängigkeit der inokulierten Pappelklone.

Klon	dpi7		dpi14		dpi21	
	M	SD	M	SD	M	SD
Aue2	0,74	1,32	8,73	9,72	12,20	13,12
P7	8,97	12,17	17,89	16,28	19,21	16,84
Max1	0,02	0,15	6,11	6,60	13,32	12,99
Rochester	2,13	2,41	10,12	6,94	19	10,45
Astria	0,18	0,50	0,79	0,84	0,77	0,96
Brauna11	0,02	0,14	0,04	0,2	0,34	0,77
T89	0	0	0,03	0,18	0,08	0,27
Androscoggin	1,76	2,64	13,22	9,22	18,49	11,20
Muhle Larson	0,33	0,78	3,12	4,13	5,51	7,12
Nisqually	3,73	2,91	11,71	6,26	18,8	8,66
Weser4	0,49	0,78	3,0	2,22	4,6	3,57
Weser6	1,7	1,47	9,4	5,9	15,6	6,94

Tabelle 6.7: Mittelwerte und Standardabweichung der infizierten Blattfläche durch *Melampsora larici-tremulae*

Tabellarisch dargestellt sind die gegenüber *Melampsora larici-tremulae* anfälligen Pappelklone mit dem Mittelwert (M) und der Standardabweichung (SD) berechnet nach der iterativ in Prozent abgeschätzten infizierten Blattfläche in Abhängigkeit von den drei Boniturzeitpunkten dpi7, dpi14 und dpi21= 7, 14 und 21 Tage nach Inokulation in Abhängigkeit der inokulierten Pappelklone.

Klon	dpi7		dpi14		dpi21	
	M	SD	M	SD	M	SD
DN5	0	0	0,03	0,14	0,03	0,16
P7	0,13	0,52	2,25	3,47	2,73	4
4x Göttingen	0,28	0,59	2,44	2,74	2,44	2,74
Astria	0,33	0,86	4,63	5,61	6,13	6,35
Brauna11	0,11	0,31	0,47	0,9	1,12	1,95
Esch5	0,05	0,22	2,24	2,89	3,18	3,61
P1	0,02	0,14	0,42	1,45	0,7	2,23
T89	0,23	0,53	1,84	2,23	2,97	3,51
Villafranca	0	0	0,1	0,3	0,2	0,82
W52	0,87	1,74	3,89	4,31	7,93	8,7

Zur grafischen Darstellung der Datenverteilung der Infektionsversuche mit *Melampsora larici-populina* (Abbildung 6.6) und *Melampsora larici-tremulae* (Abbildung 6.7) wurden jene Pappelklone, auf denen Infektionsmerkmale in Form von Sporenlagern nachgewiesen wurden mittels Boxplots dargestellt. Die Verteilung der Daten im Bezug auf das Infektionsmerkmal Nekrose für *Melampsora larici-populina* ist in Abbildung 6.8 dargestellt. Alle Grafiken wurden unter Verwendung von RStudio (RStudio Inc.) und dem Grafikpaket ggPlot (Wickham, 2009) erstellt.

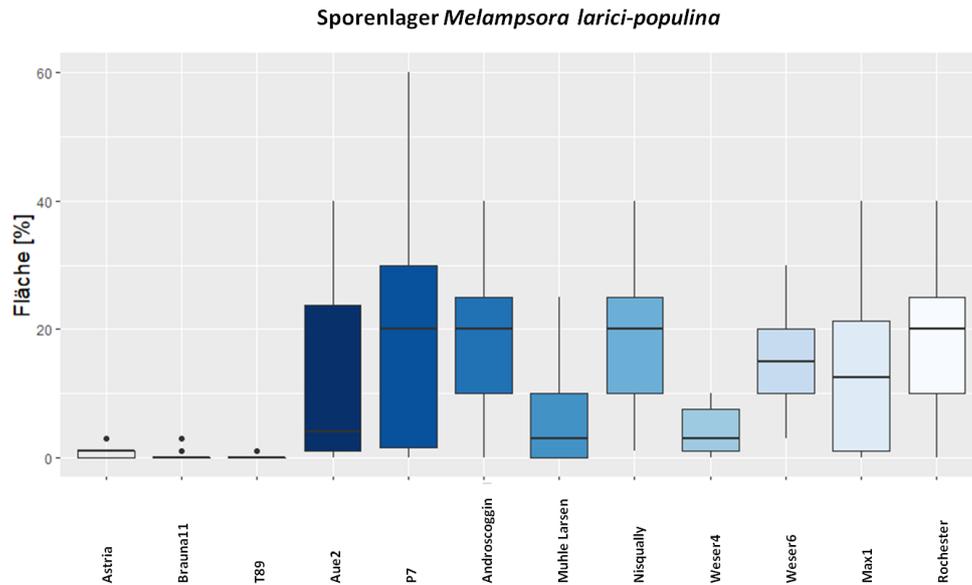


Abbildung 6.6: *Melampsora larici-populina* Inokulation verschiedener Pappelklone

Boxplots aller Klone, die nachweislich Sporenlager am 21. Tag nach der Inokulation zeigten. In die Darstellung sind sowohl Blätter mit als auch ohne Sporenlager eingeflossen. Angegeben ist die mit Sporenlagern bedeckte, iterativ bestimmte Blattfläche in Prozent, in Abhängigkeit zum analysierten Klon. Gliederung der Boxplots in 25 % Quantil, Median, 75 % Quantil, in Farbe. Extremwerte sind durch vertikale Linien dargestellt, Ausreißer als schwarze Punkte gekennzeichnet.

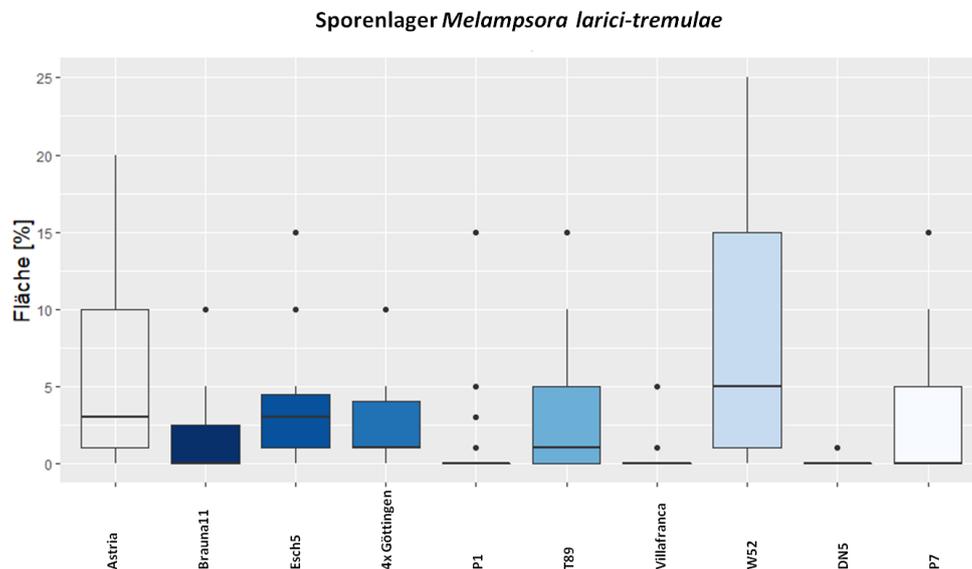


Abbildung 6.7: *Melampsora larici-tremulae* Inokulation verschiedener Pappelklone

Boxplots aller Klone, die nachweislich Sporenlager am 21. Tag nach der Inokulation zeigten. In die Darstellung sind sowohl Blätter mit Sporenlager als auch ohne Sporenlager eingeflossen. Angegeben ist die mit Sporenlagern bedeckte Blattfläche in Prozent, in Abhängigkeit zum analysierten Klon. Gliederung der Boxplots in 25 % Quantil, Median, 75 % Quantil in Farbe, Extremwerte sind durch vertikale Linien dargestellt, Ausreißer als schwarze Punkte gekennzeichnet.

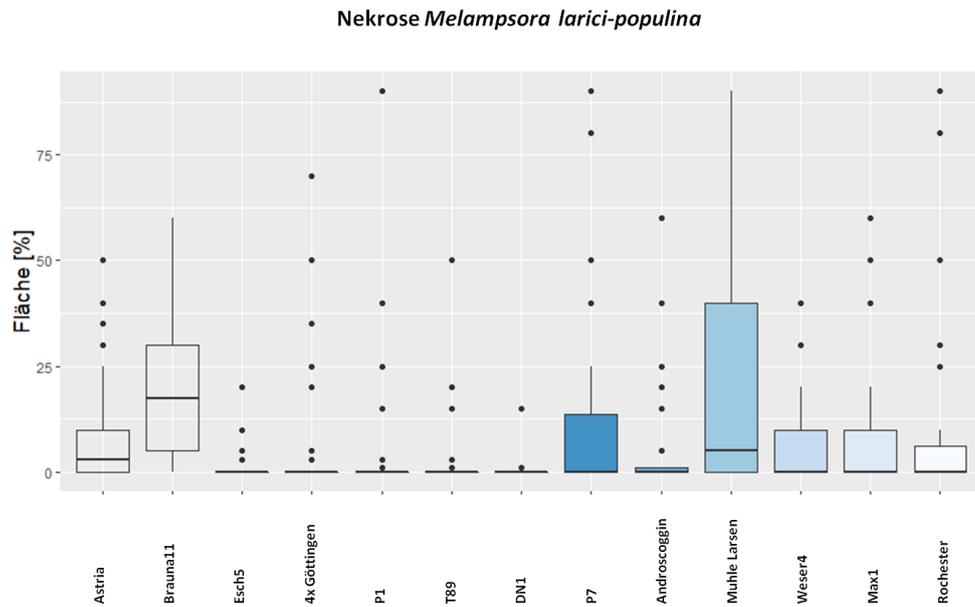


Abbildung 6.8: Nekrotische Blattfläche nach Inokulation mit *Melampsora larici-populina*

Boxplots aller Klone, die eine nekrotische Reaktion am 21. Tag nach Inokulation mit *Melampsora larici-populina* zeigten. In die Darstellung sind Blätter mit nekrotischer Fläche als auch ohne eingeflossen. Angegeben ist die iterativ bestimmte, nekrotische Blattfläche in Prozent in Abhängigkeit zum analysierten Genotyp. Gliederung der Boxplots in 25 % Quantil, Median, 75 % Quantil in Farbe, Extremwerte sind durch vertikale Linien dargestellt, Ausreißer als schwarze Punkte gekennzeichnet.

6.8.2 NFP-like modifizierte Linien

Zur statistischen Analyse einer erhöhten oder reduzierten Anfälligkeit gegenüber *Melampsora larici-tremulae* wurde der Wilcoxon Test zum Boniturtag 21 nach Inokulation durchgeführt. Die gewonnenen Ergebnisse sind in Tabelle 6.8 dargestellt. Die Versuche wurden in drei Ansätzen durchgeführt und sind dementsprechend in Tabelle 6.8 gelistet.

Tabelle 6.8: Statistische Auswertung der Infektionsversuche mit *Melampsora larici-tremulae*
Gelistet sind die durchgeführten Versuchsansätze mit den analysierten Linien. Die Bestimmung des Mittelwertes, Medians und der p-Wert nach Durchführung des Wilcoxon-Tests erfolgte auf der Datengrundlage vom Boniturtag 21.

Ansatz	Linie	Mittelwert dpi21	Median dpi21	P-Wert Wilcoxon Test	Signifikanz P<0,05
I	P1	2,26	1	-----	
	Nisqually	0	0	4,228E ⁻⁰⁹	Signifikant unterschiedlich
	N481-2	0,94	1	5,667E ⁻⁰³	Nicht signifikant unterschiedlich
	N481-9	0,29	0	9,6E ⁻⁰⁸	Signifikant unterschiedlich
	N481-15	3	1	0,1217	Nicht signifikant unterschiedlich
	N481-23	0,42	0	9,142E ⁻⁰⁶	Signifikant unterschiedlich
	N481-33	0,35	0	2,935E ⁻⁰⁶	Signifikant unterschiedlich
	N481-44	0,46	0	9,202E ⁻⁰⁷	Signifikant unterschiedlich
II	N482-24	2,09	1	0,854	Nicht signifikant unterschiedlich
	P1	6,44	5	-----	
	Nisqually	0,85	0	2,001E ⁻⁰⁹	Signifikant unterschiedlich
III	N482-47	3,91	3	5,237E ⁻⁰³	Signifikant unterschiedlich
	P1	4,19	3	-----	
	Nisqually	0,28	0	3,46E ⁻¹²	Signifikant unterschiedlich
	N481-97	3,53	3	0,741	Nicht signifikant unterschiedlich
	N483-8	1,16	1	1,041E ⁻⁰⁶	Signifikant unterschiedlich
	N484-3	2,06	1	2,438E ⁻⁰³	Signifikant unterschiedlich
N484-6	2,84	1	2,555E ⁻⁰³	Signifikant unterschiedlich	

Zur grafischen Darstellung der Datenverteilung der Infektionsversuche mit *Melampsora larici-tremulae* an den *NFP-like* modifizierten transgenen Linien wurden Boxplots gewählt (Abbildung 6.9). Die Darstellung erfolgte unter Verwendung von RStudio (RStudio Inc.) und dem Grafikpaket ggPlot (Wickham, 2009).

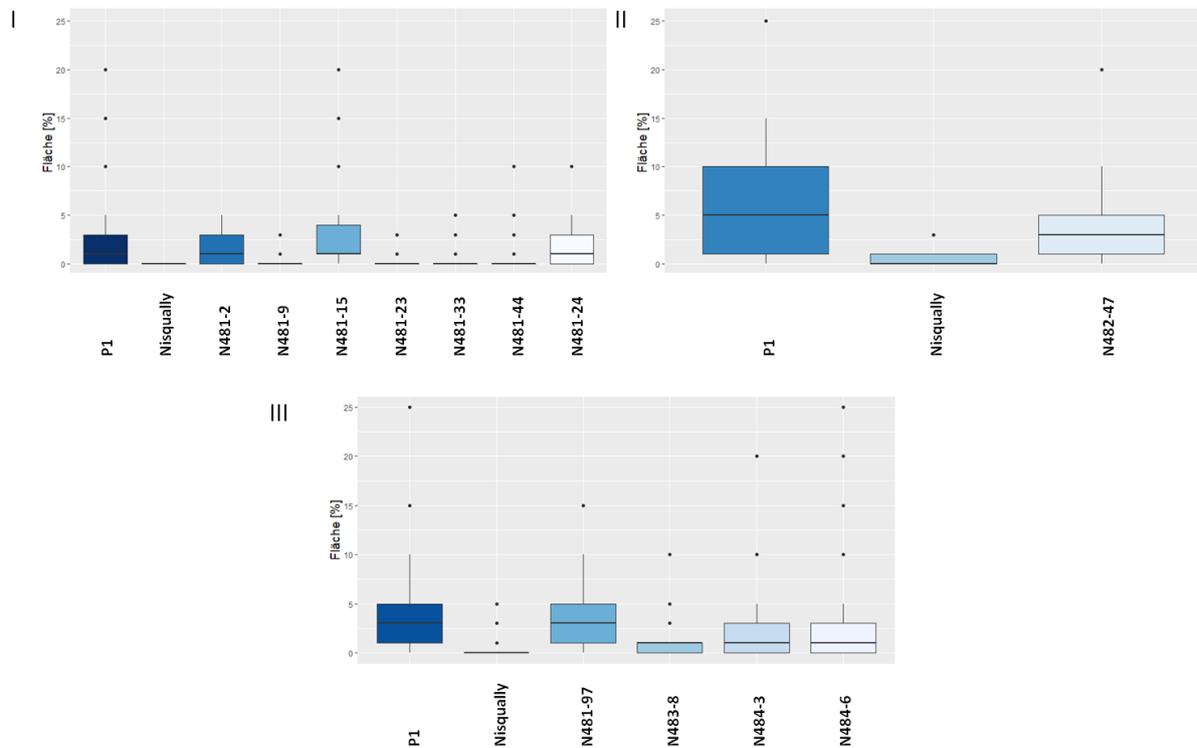


Abbildung 6.9: Verteilung der Infektion von *Melampsora larici-tremulae*

Boxplots der getesteten transgenen Linien sowie die Kontroll-Klone P1 und Nisqually. Dargestellt ist die Verteilung der Sporenlager 21. Tage nach der Inokulation, dabei wurden Blätter einbezogen auf denen Sporenlager detektiert wurden als auch jene ohne Schadbild. Boxplots sind in die Versuchsansätze I bis III unterteilt. Angegeben ist die mit Sporenlagern bedeckte, iterativ abgeschätzte Fläche in Prozent, in Abhängigkeit zum analysierten Klon bzw. transgener Linie. Gliederung der Boxplots in 25 % Quantil, Median, 75 % Quantil in Farbe, Extremwerte sind durch vertikale Linien dargestellt, Ausreißer als schwarze Punkte gekennzeichnet.

Danksagung

Danksagung

Auf diesem Wege möchte ich allen Menschen danken, die mir während der Zeit meiner Doktorarbeit bei Seite gestanden und mich unterstützt haben. Insbesondere möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen des Thünen-Institutes für Forstgenetik bedanken, die mich von Anfang an sehr herzlich aufgenommen haben. Während meiner gesamten Zeit am Thünen-Institut habe ich mich immer sehr wohl gefühlt. Ausdrücklich hervorheben möchte ich nun diejenigen, die mich während meiner Doktorarbeit besonders unterstützt haben.

Ein ganz besonderer Dank gebührt Herrn PD Dr. Matthias Fladung. Deine Tür stand immer offen und du hast mir stets alle Fragen mit Geduld und Ruhe beantwortet. Vielen Dank auch für die tollen Dienstreisen und Erfahrungen, die ich sammeln durfte.

Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Julia Kehr für die Annahme meiner Doktorarbeit als Zweitgutachterin danken.

Bei Niels Müller, Hans Hönika und Ben Bubner sowie allen anderen wissenschaftlichen Kolleginnen und Kollegen möchte ich mich für den wissenschaftlichen Austausch bedanken. Außerdem danke ich Dr. Tobias Brüggemann für seine Freundschaft und Hilfe während meiner Doktorarbeit. Meinem lieben Büronachbarn Dr. Kiran Singewar, der mir ein echter Freund geworden ist, möchte ich danken.

Nicht zuletzt möchte ich meinen technischen Assistenten danken. Olaf Polak, der mich in der Anfangszeit begleitet hat, Petra Hoffmann und Susanne Hoppe die mich immer ganz lieb unterstützt haben. Ein großer Dank an Katrin Groppe, die in der letzten Phase meiner Doktorarbeit tatkräftig an meiner Seite stand. Du bist mir in dieser Zeit sehr ans Herz gewachsen. Ebenso möchte ich mich bei Doris Ebbinghaus, Anke Schellhorn und Angelika Worm bedanken. Susanne Jelkmann danke ich für ihre Freundschaft und ihr immer offenes Ohr.

Außerdem möchte ich mich bei den Kolleginnen und Kollegen der Gärtnerei für die Pflege meiner Pappeln bedanken. Insbesondere Gundel Wiemann, die sich sehr liebevoll um meine kleinen Pflänzchen gekümmert hat.

Ein weiterer großer Dank gilt meiner Familie, die mich immer tatkräftig unterstützt hat. Meinem Mann Hendrik möchte ich danken, du hast mir Zuspruch und Rückhalt gegeben. Außerdem möchte ich meinen Eltern Heike und Edgar dafür danken, dass ihr immer für mich da seid.

Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Khira Deecke, an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig verfasst wurde, ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe und die Arbeit von mir vorher nicht einem anderen Prüfungsverfahren eingereicht wurde.

Hamburg, den 22. April 2021

Khira Deecke