

# Beiträge von Forstpflanzenzüchtung und Forstgenetik für den Wald von Morgen

7. Tagung der Sektion Forstgenetik/Forstpflanzen-  
züchtung vom 12. bis 14. September 2022 in Ahrensburg

Tagungsband

Mirko Liesebach (ed.)

Thünen Report 105

**Bibliografische Information:**  
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikationen in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet unter [www.dnb.de](http://www.dnb.de) abrufbar.

*Bibliographic information:*  
*The Deutsche Nationalbibliothek (German National Library) lists this publication in the German National Bibliography; detailed bibliographic data is available on the Internet at [www.dnb.de](http://www.dnb.de)*

Bereits in dieser Reihe erschienene Bände finden Sie im Internet unter [www.thuenen.de](http://www.thuenen.de)

*Volumes already published in this series are available on the Internet at [www.thuenen.de](http://www.thuenen.de)*

**Zitationsvorschlag – Suggested source citation:**

**Liesebach M (ed.)** (2023) Beiträge von Forstpflanzenzüchtung und Forstgenetik für den Wald von Morgen : 7. Tagung der Sektion Forstgenetik/Forstpflanzenzüchtung vom 12. bis 14. September 2022 in Ahrensburg : Tagungsband. Braunschweig: Johann Heinrich von Thünen-Institut, 318 p, Thünen Rep 105, DOI:10.3220/REP1681451577000

Die Verantwortung für die Inhalte liegt bei den jeweiligen Verfassern bzw. Verfasserinnen.

*The respective authors are responsible for the content of their publications.*



THÜNEN

## Thünen Report 105

Herausgeber/Redaktionsanschrift – Editor/address

Johann Heinrich von Thünen-Institut  
Bundesallee 50  
38116 Braunschweig  
Germany

[thuenen-report@thuenen.de](mailto:thuenen-report@thuenen.de)  
[www.thuenen.de](http://www.thuenen.de)

ISSN 2196-2324

ISBN 978-3-86576-265-8

DOI:10.3220/REP1681451577000

urn:nbn:de:gbv:253-202304-dn066221-6

# **Beiträge von Forstpflanzenzüchtung und Forstgenetik für den Wald von Morgen**

**7. Tagung der Sektion Forstgenetik/Forstpflanzen-  
züchtung vom 12. bis 14. September 2022 in Ahrensburg**

**Tagungsband**

**Mirko Liesebach (ed.)**

**Thünen Report 105**

Mirko Liesebach (ed.)  
Thünen-Institut für Forstgenetik  
Sieker Landstr. 2  
22927 Großhansdorf  
Tel.: +49 4102 696156  
E-Mail: [mirko.liesebach@thuenen.de](mailto:mirko.liesebach@thuenen.de)

**Thünen Report 105**

Braunschweig/Germany, April 2023

## Neue biotechnologische Methoden für Gehölze

TOBIAS BRÜGMANN, VIRGINIA ZAHN, ALEXANDER FENDEL, STEFAN ZEBBEDIEN, ALICE-JEANNINE SIEVERS, DIRK BECKER, MATTHIAS FLADUNG

Als neue biotechnologische Methoden werden Verfahren zur gezielten Veränderung des Erbguts zusammengefasst, die durch Zinkfinger-Nukleasen, *transcription activator-like endonucleases* (TALENs) und CRISPR/Cas erreicht werden („Genomeditierung“, BOCH et al. 2009; JINEK et al. 2012; SHUKLA et al. 2009). Für die jüngste dieser Methoden wurden im Jahr 2020 Emmanuelle Charpentier und Jennifer A. Doudna mit dem Chemie-Nobelpreis ausgezeichnet. Sie haben maßgeblich die Genschere CRISPR/Cas9 entwickelt, mit der sich das Erbgut von Mikroorganismen, Pilzen, Pflanzen und Tieren schnell, günstig und präzise verändern lässt. Genomeditierungen ermöglichen das zielgenaue Ausschalten (*Knockout*) von Genen auf DNA-Ebene. Damit sind sie ein Fortschritt im Vergleich zu vorherigen Methoden, wie beispielsweise die RNA-Interferenz, die auf posttranskriptioneller Ebene eine, häufig unvollständige, Herunterregulation von Genexpressionen bewirkt. Gen-*Knockouts* werden zur Aufklärung von Genfunktionen verwendet, indem daraus resultierende, phänotypische Veränderungen analysiert werden. Aufgrund der einfachen Umsetzbarkeit und großen Zielgenauigkeit bei der genetischen Bearbeitung bietet die CRISPR/Cas-Technologie der Pflanzenforschung vielversprechende Perspektiven.

Die drängenden Herausforderungen des Klimawandels sind durch extrem trockene Sommer in der Landschaft unübersehbar: Nur 21% der Waldbäume in Deutschland weisen keine geschädigte Krone auf (BMEL 2022) auf. Um die genetische Grundlage der Trockenstresstoleranz in Bäumen zu erforschen, ist die Übertragung der Genomeditierungstechniken auf Waldbäume ein Werkzeug mit großem Potenzial. Durch gezielte genetische Veränderungen bei anpassungsrelevanten Genen kann deren Einfluss auf die Trockenstresstoleranz und den dahinterstehenden physiologischen Prozessen ermittelt werden. Die Erkenntnisse können in der Forstpflanzenzüchtung berücksichtigt werden, z. B. bei der Auswahl von geeignetem Vermehrungsmaterial.

Für Pappeln, insbesondere Aspenhybriden der Gattung *Populus*, die etablierte Modellorganismen in der biotechnologischen Forschung sind, stehen zahlreiche molekulare Werkzeuge und Genomsequenzen zur Verfügung, die CRISPR/Cas-Genomeditierungen ermöglichen. In Aspen und deren Hybriden wurden in der Vergangenheit bereits sehr effizient CRISPR/Cas9-vermittelte Gen-Knockouts ausgelöst, um deren physiologische Funktion aufzuklären (FLADUNG 2021; MÜLLER et al. 2020; BRUEGMANN et al. 2019). Grundlage der zielgenauen Wirkung der Cas9-Nuklease ist die Verwendung einer der Zielsequenz entsprechenden RNA (sgRNA), die die Nuklease an genau die Stelle des Erbguts führt, an der die DNA geschnitten werden soll. Durch den Schnitt entsteht ein DNA-Doppelstrangbruch. Nach Aktivierung des zelleigenen Reparatursystems wird die geschnittene DNA wieder zusammengefügt, wobei allerdings Fehler passieren können und somit Mutationen entstehen (zumeist Insertion oder Deletion von einzelnen Basenpaaren am vorgesehenen Genort). Anhand unterschiedlicher Editierungseffizienzen wurden Kriterien für das jeweils passende sgRNA-Design aufgestellt (BRUEGMANN et al. 2019). Da Cas9 für einige Gene nicht geeignet ist, wurden am Institut 2022 Genomeditierungen mit einer anderen Cas-Nuklease (Cas12a, ehemals als Cpf1 bezeichnet) in *P. × canescens* durchgeführt, wobei spezielle Editierungsmuster identifiziert wurden. Weitergehende, darauf aufbauende Techniken rücken zunehmend in den Fokus. Beispielsweise wird im BMEL-/FNR-Forschungsprojekt „TreeEdit“ die Funktionsfähigkeit von Methoden zum präzisen Einbau bzw. Austausch von Sequenzen durch Homologie-abhängige Reparaturmechanismen untersucht.

Die Forschungsarbeiten sind begleitet von wichtigen Aspekten der Sicherheits- und Risikoforschung. Daher werden genomeditierte Pflanzen auf unbeabsichtigte Editierungen, sogenannte *Off-Target*-Effekte, untersucht und Protokolle zum Nachweis von Genomeditierungen erarbeitet. Nach bisherigen Erkenntnissen anhand von DNA-Sequenzierungen infrage kommender Genorte sind zielspezifische Genomeditierungsansätze sehr exakt, sodass *Off-Target*-Effekte äußerst selten auftreten.

In einem abgeschlossenen Projekt zur DNA-freien Genomeditierung wurden spezielle Methoden untersucht, die auf rekombinanten Proteinen als Ribonukleotidprotein-Komplexe (RNPs) basieren. Der Einbau von artfremder Erbinformation wird auf diesem Wege grundsätzlich ausgeschlossen (BRÜGMANN und FLADUNG 2019). Die RNPs wurden erfolgreich in unterschiedliche Zelltypen von Pappeln (*P. xcanescens* und *P. tremula* × *P. tremuloides*) und Modellorganismen wie Tabak (*Nicotiana tabacum*) eingeschleust. Der Nachweis einer Genomeditierung durch RNPs steht noch aus.

Ein weiterer Ansatz hinsichtlich Biosicherheitsaspekten ist die Verwendung von Nickasen anstelle von Nukleasen. Nickasen lösen DNA-Einzelstrangbrüche aus, die im Gegensatz zu von Nukleasen ausgelösten DNA-Doppelstrangbrüchen mit deutlich höherer Wahrscheinlichkeit fehlerfrei repariert werden (FAUSER et al. 2014). Eine Genomeditierung wird nur dann ausgelöst, wenn zwei Nickasen an gegensätzlichen DNA-Einzelsträngen in definiertem Abstand zueinander platziert werden (RAN et al. 2013). Weil nur beim Zusammentreffen der beiden Zielregionen eine Editierung auftritt und gleich zwei sgRNAs zur Zieldeterminierung über die Editierung entscheiden, sind *Off-Target*-Editierungen technisch praktisch ausgeschlossen. Die Nickase-vermittelten Editierungen führten zu Deletionen größerer DNA-Bereiche zwischen den beiden sgRNA-Sequenzen, was mit klassischen, Cas9-vermittelten Editierungen nicht erreicht wurde.

Während Genomeditierungen in Pappeln (*P. xcanescens*, *P. tremula*, *P. tremula* × *P. tremuloides*) effizient funktionieren, wurden Genomeditierungstechniken in europäischen Waldbaumarten im engeren Sinne bislang nicht getestet. Im laufenden Projekt „TreeEdit“ werden Forschungen zur Editierung der Rotbuche (*Fagus sylvatica*) angestrengt. Dabei werden drei, zur Etablierung grundlegende Schritte durchgeführt: *in vitro*-Kultivierung, genetische Transformation und CRISPR/Cas-Editierung. Die *in vitro*-Kultivierung hat erste Erfolge gezeigt, sodass Pflanzenmaterial für die genetische Transformation und die nachgeschaltete Editierung zur Verfügung steht. Außerdem wird anhand bestehender *in vitro*-Kulturen die Editierbarkeit von Gemeiner Esche (*Fraxinus excelsior*), Stieleiche (*Quercus robur*) und dem Chinesischen Götterbaum (*Ailanthus altissima*) geprüft.

## Referenzen

- BOCH J, SCHOLZE H, SCHORNACK S, LANDGRAF A, HAHN S, KAY S, LAHAYE T, NICKSTADT A, BONAS U (2009) Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326: 1509–1512. doi:10.1126/science.1178811
- BRUEGMANN T, DEECKE K, FLADUNG M (2019) Evaluating the Efficiency of gRNAs in CRISPR/Cas9 Mediated Genome Editing in Poplars. *IJMS* 20: 3623. doi:10.3390/ijms20153623
- BRÜGMANN T, FLADUNG M (2019) Genom-Editierung in Bäumen. *AFZ-DerWald*: 16–18
- BMEL [Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft] (Hrsg) (2022) Ergebnisse der Waldzustandserhebung 2021. <https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/DE/Broschueren/ergebnisse-waldzustandserhebung-2021.pdf>
- FAUSER F, SCHIML S, PUCHTA H (2014) Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal* 79: 348–359. doi:10.1111/tpj.12554
- FLADUNG M (2021) Targeted CRISPR/Cas9-Based Knock-Out of the Rice Orthologs *TILLER ANGLE CONTROL 1 (TAC1)* in Poplar Induces Erect Leaf Habit and Shoot Growth. *Forests* 12: 1615. doi:10.3390/f12121615
- JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, HAUER M, DOUDNA JA, CHARPENTIER E (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)* 337: 816–821. doi:10.1126/science.1225829
- MÜLLER NA, KERSTEN B, LEITE MONTALVÃO AP, MÄHLER N, BERNHARDSSON C, BRÄUTIGAM K, CARRACEDO LORENZO Z, HOENICKA H, KUMAR V, MADER M, PAKULL B, ROBINSON KM, SABATTI M, VETTORI C, INGVARSSON PK, CRONK Q, STREET NR, FLADUNG M (2020) A single gene underlies the dynamic evolution of poplar sex determination. *Nat. Plants* 6: 630–637. doi:10.1038/s41477-020-0672-9
- RAN FA, HSU PD, LIN C-Y, GOOTENBERG JS, KONERMANN S, TREVINO AE, SCOTT DA, INOUE A, MATOBA S, ZHANG Y, ZHANG F (2013) Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* 154:1380–1389. doi:10.1016/j.cell.2013.08.021
- SHUKLA VK, DOYON Y, MILLER JC, DEKELVER RC, MOEHLE EA, WORDEN SE, MITCHELL JC, ARNOLD NL, GOPALAN S, MENG X, CHOI VM, ROCK JM, WU Y-Y, KATIBAH GE, ZHIFANG G, MCCASKILL D, SIMPSON MA, BLAKESLEE B, GREENWALT SA, BUTLER HJ, HINKLEY

SJ, ZHANG L, REBAR EJ, GREGORY PD, URNOV FD (2009) Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature* 459: 437–441. doi:10.1038/nature0792

### **Autorinnen und Autoren**

TOBIAS BRÜGMANN, VIRGINIA ZAHN, ALEXANDER FENDEL, STEFAN ZEBBEDIEN, ALICE-JEANNINE SIEVERS, MATTHIAS FLADUNG  
Thünen-Institut für Forstgenetik, Sieker Landstraße 2, 22927 Großhansdorf  
Kontakt: tobias.bruegmann@thuenen.de

DIRK BECKER  
Universität Hamburg, Molekulare Pflanzengenetik, Ohnhorststraße 18, 2609 Hamburg