

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Schlussbericht

Etablierung neuer Züchtungstechnologien in der Kulturart Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L.) zur Genom-Editierung (Akronym: ENABLE)

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 031B0801B gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Teilprojekt B (AP2):

Entwicklung eines Regenerationssystems für Zuckerrübe und
Agrobacterium-gestützte Transfer-Methoden

Zuwendungsempfänger: Strube Research GmbH & Co. KG,
Hauptstraße 1, 38387 Söllingen

Ausführende Stelle: Strube Research GmbH & Co. KG, Fachbereich Biotechnologie,
Neue Straße 11, 38838 Schlanstedt

Projektleitung: Dr. Andreas Müller

Berichterstellung: Dr. Katja Kempe, Dr. Andreas Müller

Laufzeit: 01.04.2019 bis 30.09.2022

Teil I - Kurzbericht

Im Verbundprojekt ENABLE arbeitete Strube Research GmbH & Co. KG als Wirtschaftspartner mit dem KMU Crop Genetic Systems (CGS Hamburg, Koordinationspartner) und den akademischen Partnern, Universität Hamburg und CAU Kiel, zusammen. Gegenstand des Projekts war die Etablierung neuer Genomeditierungsverfahren durch ortsspezifische Endonukleasen in der Kulturart Zuckerrübe. Hierdurch sollte ein Werkzeug zur Beschleunigung des Züchtungsfortschritts bereitgestellt und ein Einsatz des Verfahrens sowohl in der Forschung als auch der Entwicklung neuer Sorten ermöglicht werden. Die Anwendung der Genomeditierung setzt die Verfügbarkeit mehrerer Techniken der Gewebekultur voraus. Dies sind 1) ein effizientes Transfer-Verfahren der Endonukleasen in die Pflanzenzellen, 2) eine effektive Selektion editierter Zellen und 3) die Regeneration genomeditierter Zuckerrüben. Ein Schwerpunkt sollte auf innovativen, transgenfreien Methoden liegen, da Produkte, die mit diesen Techniken entwickelt wurden, größere politische und gesellschaftliche Akzeptanz finden könnten. Exemplarisch sollten im Rahmen des Projekts bereits züchterisch relevante Eigenschaften als Ziele der Mutagenese verwendet werden. Diese sind Resistenz gegen Rübenzystennematoden und eine Verringerung der Schossneigung, zwei wirtschaftlich bedeutende Faktoren in der Zuckerrübenzüchtung.

Eine der Hauptaufgaben des Partners Strube lag in der Bereitstellung geeigneter Zuckerrüben-Genotypen und Protokolle zur Regeneration dieser Genotypen in der Gewebekultur. In Vorversuchen konnten bereits zwei Genotypen aus dem Strube-Zuchtmaterial identifiziert werden, bei denen sich morphogener, d.h. regenerierbarer Kallus induzieren lässt (Protokoll modifiziert nach Tomita *et al.*, 2013). Die beiden Genotypen wurden als Basis zur Selektion weiterer Genotypen herangezogen. Für diese Selektion wurden 140 Genotypen einer genetischen Distanzanalyse mittels *Single Nucleotide Polymorphism*-Markern unterzogen. Anhand der Ergebnisse wurden 25 Genotypen für Gewebekulturversuche ausgewählt, wobei die Auswahl sowohl Linien mit hoher Ähnlichkeit zu den beiden aus Vorversuchen bekannten Genotypen als auch Linien mit großer genetischer Distanz zueinander umfasste. Ziel dieses Vorgehens war einerseits die Identifizierung geeigneter Genotypen für die Kallusinduktion und Regeneration aufgrund ihrer genetischen Nähe zu den bekannten Genotypen, andererseits die Prüfung genetisch diverser Genotypen auf eine möglicherweise höhere Eignung. Im Rahmen des AP ST2.1 (Etablierung eines Regenerationsprotokolls für Zuckerrübe) wurde das Verhalten von Explantaten (Blatt und Petiole) auf Nährmedium mit vier verschiedenen Phytohormonen in unterschiedlichen Konzentrationen getestet. Die Beobachtungen schlossen dabei beide möglichen Wege der Regeneration ein, d.h. direkte und (über eine Kallusphase) indirekte Regeneration. Von den verwendeten Phytohormonen eignete sich nur das Cytokinin (BAP) sowohl zur direkten Regeneration als auch zur Induktion eines regenerativen Kallus. 13 Genotypen, die bei Behandlung mit BAP zur Induktion eines Kallus fähig waren, wurden für einen weiteren Versuch ausgewählt, in dem sechs Kombinationen des Cytokinins BAP und des Auxins 2,4-D getestet wurden. Da der Zusatz des Auxins in allen Fällen die Bildung eines regenerativen Kallus behinderte, wurde dieser Weg verworfen. Die vier in den bisherigen Gewebekulturversuchen bestgeeigneten Genotypen wurden zur Untersuchung der folgenden Einflussfaktoren auf die Kallusinduktion bzw. indirekte Regeneration eingesetzt: 1) Einfluss unterschiedlicher Lichtbedingungen vor und während der Kallusinduktion, 2) Einfluss eines Auxin-Synthese-Inhibitors, 3) Einfluss unterschiedlicher Stammmedien zur Kallusinduktion und Prüfung des Zusatzes von Caseinhydrolysat, 4) Einfluss der Hormonzusammensetzung auf die Regeneration nach Kagami *et al.*, 2015, und Kong *et al.*, 2020. Für drei Genotypen konnte ein geeignetes Protokoll zur indirekten Regeneration erstellt werden. Die Kallusinduktionsrate lag bei 83-96% (Blatt bzw. Petiol). Die Regenerationseffizienz variierte von

0,1 bis 1. Darüber hinaus konnte ein weiterer Genotyp identifiziert werden, der auf Cytokinin-haltigem MS-Medium zwar keine Kallusbildung zeigt, jedoch eine gute direkte Regeneration bei Petiol-Explantaten aufweist (circa 14% der Explantate). Somit konnte die Entwicklung eines Regenerationssystems im Rahmen des Projekts erfolgreich abgeschlossen werden. Die bei Strube Research als geeignet identifizierten Genotypen wurden in Form von Saatgut und *in vitro*-Klonen vermehrt und allen Projektpartnern bereitgestellt. Ebenso wurden die Protokolle zur Kallusinduktion und Regeneration zur Verfügung gestellt.

Zur Überprüfung der Funktionalität von Transformationsvektoren (insbesondere zielgesteuerter Endonukleasen) in Zuckerrübe sollte ein transientschneller Schnelltest entwickelt werden (ST2.2 Etablierung der *Agrobacterium*-Infiltration für Zuckerrübe). Anhand von GUS-Reporterplasmiden konnte gezeigt werden, dass die Expression des Transgens im Vergleich zu *Nicotiana benthamiana* zwar deutlich geringer ist, jedoch die Technik der *Agrobacterium*-Infiltration für Zuckerrüben funktioniert. Zur Erhöhung der Expression wurden Plasmide mit drei viralen Silencing-Suppressoren kloniert und die entsprechenden *Agrobacterium*-Stämme mit dem das Reportergen tragenden Stamm co-infiltriert. Eine Erhöhung der Reportergen-Expression konnte hierdurch nicht erreicht werden. Die Versuche zeigten aber, dass das Alter der Pflanzen und die Kulturbedingungen die Stärke der Expression beeinflussen. Die in ST2.2 etablierten Bedingungen wurden zur Infiltration von Zuckerrüben mit *Agrobacterium*-Stämmen mit Endonuklease-Plasmiden verwendet (ST2.3 Entwicklung eines transienten Nuklease-Schnelltests). Die Plasmide wurden von den Kooperationspartnern aus Hamburg und Kiel bereitgestellt. Da DNA-Extraktion infiltrierter Blätter und Sanger-Sequenzierung der entsprechenden Target-Sites keinen Nachweis für Genomeditierung erbringen konnten, wurden zusätzlich *Next-Generation Sequencing* (NGS) - Analysen der PCR-Fragmente durchgeführt, wodurch aber ebenfalls keine Mutagenese nachgewiesen werden konnte. Die Infiltration wurde zudem zur Expressionsanalyse der Endonukleasen mittels RT-qPCR wiederholt. Hierdurch konnte in einer von drei untersuchten Pflanzen (jedoch in allen infiltrierten Blättern dieser Pflanze) eine schwache Expression detektiert werden. Aufgrund der GUS-Expressionsdaten und RT-qPCR-Ergebnisse für die Endonuklease-Gene scheint es denkbar, dass die Expressionsstärke der verwendeten Transgen-Konstrukte in *Beta vulgaris* erhöht werden muss, um eine effiziente Genomeditierung zu ermöglichen.

Auf Basis der Ergebnisse aus ST2.1 wurden unter Verwendung der selektierten Genotypen Arbeiten zur Entwicklung eines *Agrobacterium*-gestützten Transformationssystems (ST2.4) durchgeführt. Dabei wurde als erstes eine Methodik zur Co-Kultivierung von Kallus mit dem Stamm GV3101 verwendet (modifiziert nach Kong *et al.*, 2020, und Kishchenko *et al.*, 2005). In der Projektlaufzeit wurden insgesamt vier dieser Transformationen mit je zwei bis drei Genotypen nach diesem Protokoll durchgeführt. Dabei konnten transgene Kalluskulturen mit einer Effizienz von 7-88% (Kalluskulturen mit GUS-Expression in Teilen der Kultur) erhalten werden. Ebenso konnten Regenerate aus diesen Kulturen erhalten werden, die jedoch nicht transgen waren. In einer Transformation wurde ein Plasmid mit einem Endonukleasegen verwendet und eine NGS-Analyse durchgeführt, jedoch konnte kein Hinweis auf Genomeditierung gefunden werden. Parallel dazu wurden die *Agrobacterium*-gestützte Transformation von Explantaten mit nachträglicher, indirekter Regeneration (angelehnt an Kishchenko *et al.*, 2005, und Kempe *et al.*, 2009) sowie zwei Protokolle zur Transformation über direkte Regeneration (Wu *et al.*, 2015, und Norouzi *et al.*, 2005) getestet. Auch diese Versuche führten nicht zur Herstellung transgener Zuckerrüben. Somit wurde das Ziel dieses Arbeitspakets nicht erreicht, allerdings konnte mit dem Nachweis transgener Kalluskulturen ein Teilerfolg erzielt werden.

Teil II - Eingehende Darstellung

Die Arbeiten bei Strube zu AP2 (Entwicklung eines Regenerationssystems für Zuckerrübe und *Agrobacterium*-gestützte Transfer-Methoden) gliederten sich in vier Teile, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

ST2.1: Etablierung eines Regenerationsprotokolls für Zuckerrübe

Aus vorherigen Arbeiten bei Strube waren vor Projektstart zwei Genotypen des Strube-Zuchtmaterials bekannt, die auf Cytokinin-haltigem Medium regenerationsfähigen Kallus bildeten (GT31 und GT58; Protokoll modifiziert nach Tomita *et al.*, 2013). Bei diesen Arbeiten hatte sich gezeigt, dass sowohl Kallusinduktion als auch Pflanzenregeneration sehr stark Genotypen-abhängig ist. Zum Projektstart wurden diese zwei sowie zwei Genotypen des Projektpartners CAU Kiel (inkl. *Beta vulgaris* subsp. *maritima*) als Ausgangsmaterial für Versuche verwendet. Darüber hinaus wurden weitere Strube-Genotypen für Gewebekultur-Tests ausgewählt. Zur Selektion wurde eine genetische Charakterisierung und Gruppierung mittels genetischer Distanz (GD)-Analyse durchgeführt. Insgesamt wurden 140 Genotypen (95 Bestäuber und 45 O-Typen) mit einem Set von 155 genomweiten Markern über die bei Strube verfügbare Hochdurchsatz-Plattform (*SNPline*, LGC Genomics) analysiert. Zusätzlich erfolgte eine Genotypisierung des *BvBTC1*-Gens (Regulation des Schossverhaltens) und der Loci für Nematoden-Toleranz bzw. -Resistenz (Zielmerkmale im Projekt) durch entsprechende Markersets. Die Daten zeigen, dass die Genotypen jeweils drei genetische Cluster für Bestäuber- und O-Typ-Linien bilden (Abbildung 1). 15 Genotypen (blau) konnten keiner dieser sechs Gruppen zugeordnet werden. Darunter sind zumeist „exotische“ Genotypen, die zurzeit nicht in der Züchtung verwendet werden. Die beiden o.a. Strube-Genotypen GT31 und GT58 clustern in der gleichen Gruppe und haben eine genetische Distanz von 0,495 zueinander. Anhand der kalkulierten genetischen Distanz (Modified Rogers' Distance, MRD) wurden 25 Genotypen ausgewählt. Die Auswahl umfasste a) sieben Linien mit hoher Ähnlichkeit zu GT58 (genetische Distanz 0,197-0,434), b) acht Linien mit hoher Ähnlichkeit zu GT31 (genetische Distanz 0,211-0,449) und c) zehn Linien mit der höchsten Distanz zu beiden Genotypen (sechs O-Typen und vier Bestäuber).

Für die erste Versuchsreihe in der Gewebekultur wurden Petiol und Blattspreite von *in vitro*-Klonen als Explantate verwendet (n=36 für jede Bedingung). Das Medium (MSmT) basierte auf Tomita *et al.*, 2013 (MS-Medium mit halber Ammoniumnitrat-Konzentration, 0,25 g/l 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) als pH-Puffer, 30 g/l Zucker und verfestigt mit 2,5 g Gelrite). Variiert wurde die Zugabe des Phytohormons, wobei vier Phytohormone (Benzylaminopurin (BAP), 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D), Phenyllessigsäure (PAA), Clopyralid) in zwei Konzentrationen (0,5 oder 5 µM) getestet wurden. Clopyralid gehört wie 2,4-D und PAA zu den Auxinen und findet landwirtschaftliche Anwendung in Form eines Herbizids u.a. im Zuckerrübenanbau. Der Versuch erfolgte bei 25°C ohne Licht und wurde für 7

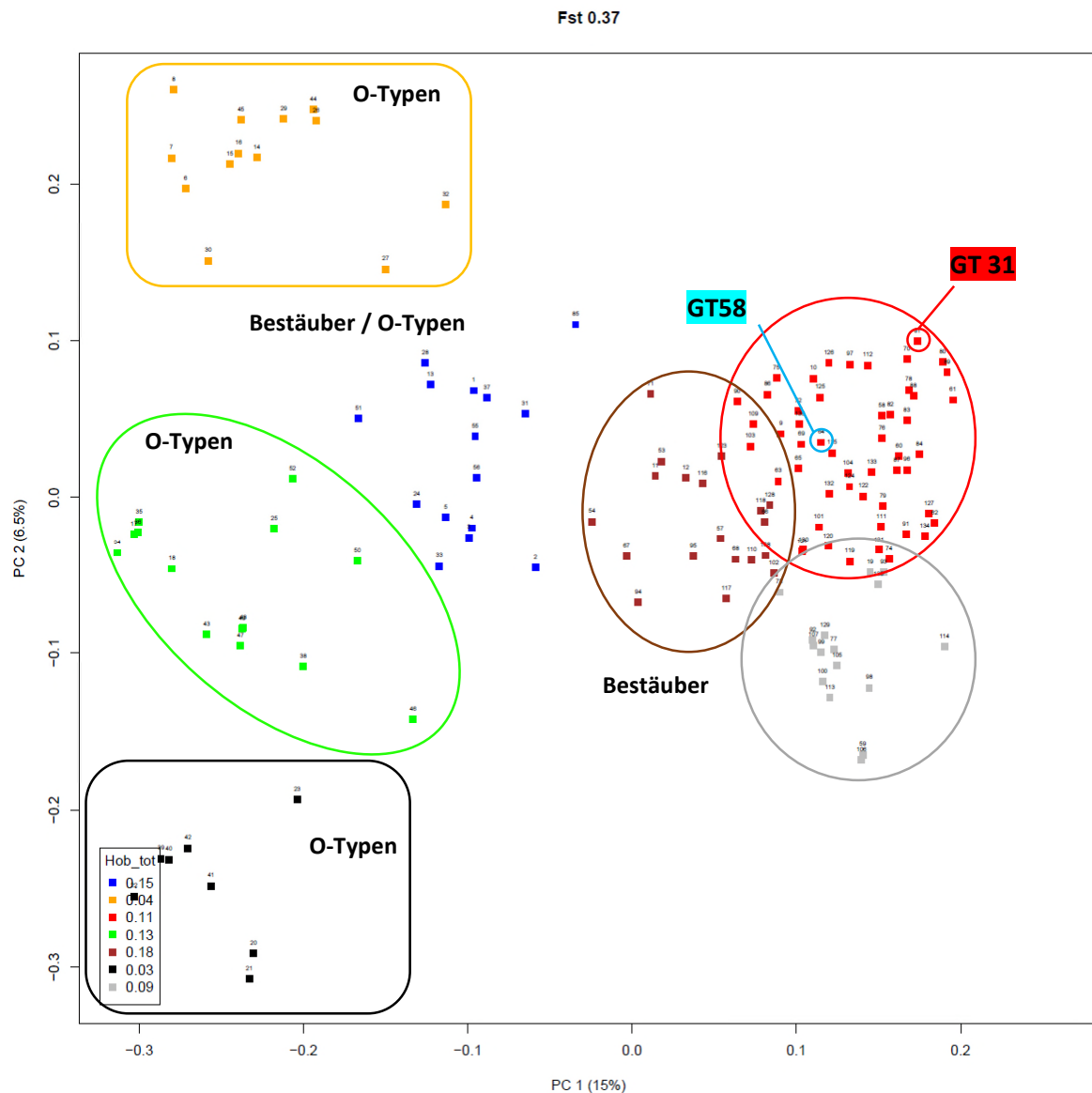


Abbildung 1 PCA (Principle Component Analysis) auf Basis der Markerdaten für 140 Genotypen. Grafische Darstellung der ersten zwei Hauptkomponenten (PC1 = 15%, PC2 = 6,5%) des paarweisen Vergleichs der Markerdaten über alle Linien. Jeder Punkt entspricht einem Genotyp. Fst: Maß für den Grad der Differenzierung zwischen den Gruppen (Allelfrequenz; 0 - keine genetische Divergenz, 1 - Fixierung alternativer Allele). Hob_tot: Heterozygotie berechnet für jede Gruppe.

Wochen mit wöchentlicher Dokumentation geführt, wobei sowohl auf die Bildung direkter Regenerate als auch die Induktion von Kallus geachtet wurde. Direkte Regeneration konnte bei einigen Genotypen bereits 1-2 Wochen nach Inkubation auf BAP-haltigem Medium festgestellt werden. Bei Einsatz von Auxin-haltigem Medium trat direkte Regeneration nur noch sporadisch und i.d.R. einige Wochen später auf. Im Falle des Auftretens von Kallus wurde dieser auf hormonfreies oder BAP-haltiges Medium transferiert und für vier Wochen bei 16 Stunden Licht und 21°C inkubiert. Es konnte bei den meisten Genotypen Kallus über BAP und/oder 2,4-D induziert werden, es war jedoch kaum Kallusbildung auf Medium mit PAA oder Clopyralid zu beobachten (s. Tabelle 1). Die Kalli waren sehr unterschiedlich in Ihrem Erscheinungsbild. Der BAP-induzierte Kallus war locker, hell und erschien 6-7 Wochen nach

Induktion. Der 2,4-D-induzierte Kallus war körnig, dunkel und zum Teil noch fest mit dem Explantat verbunden. Letzterer trat bei einigen Genotypen bereits 4 Wochen nach Induktion auf. In manchen Genotypen bildeten sich kurze Wurzeln aus dem Kallus (Wurzelkallus). Bei PAA und Clopyralid war zumeist nur basipetal orientierte Wurzelbildung ohne Kallus zu beobachten. Nach Transfer des Kallus zeigte sich, dass der BAP-induzierte Kallus anwächst und grüne Strukturen ausbildet (Caulogenese), die jedoch nur in wenigen Fällen zu Adventivsprossen regenerierten. Kallus, der durch 2,4-D induziert wurde, führte nur bei vier Genotypen zur Bildung von Regeneraten, die allerdings entweder schwarz wurden oder nur noch Wurzeln bildeten, jedoch keinen Spross (Rhizogenese). Die Ergebnisse deuteten somit auf eine vergleichsweise gute Eignung des Cytokinins BAP sowohl für die Induktion von regenerationsfähigem Kallus als auch für die Bildung direkter Regenerate.

	Phytohormon	Wurzel	Wurzel-kallus	direkte Regenerate	Kallus	regenerations-fähiger Kallus*
Cytokinin	0,5 µM BAP	9	0	9	13	8
	5 µM BAP	1	0	7	12	
Auxine	0,5 µM 2,4-D	1	13	0	10	0
	5 µM 2,4-D	0	0	0	23	0
	0,5 µM PAA	24	0	3	2	0
	5 µM PAA	21	0	1	1	0
	0,5 µM Clopyralid	25	0	1	2	0
	5 µM Clopyralid	24	0	3	4	0

Tabelle 1 Morphogenese bei Explantaten selektierter Genotypen. Angegeben ist die Anzahl der Genotypen, die Wurzel, Wurzelkallus, direkte Regenerate, Kallus oder regenerationsfähigen Kallus bildeten. * Sprossregeneration. Bei Behandlung mit unterschiedlichen BAP-Konzentrationen (0,5 µM und 5 µM) bildeten dieselben 8 Genotypen Sprosse.

Gürel *et al.*, 2001, beschreiben indirekte Regeneration durch Vorbehandlung sterilisierter Keimlinge auf 2,3,5-Triiodbenzoesäure (TIBA, Inhibitor des polaren Auxintransports) und BAP mit anschließender Kallusinduktion unter Verwendung von 1 mg/l (5 µM) BAP und 0,5 - 1 mg/l (2,5 - 5 µM) 2,4-D. Dabei wurden zwei Typen von Kalli definiert, Typ I (weiß, locker, induzierbar über Cytokinin (BAP) oder ohne Hormon) und Typ II (grün und kompakt, häufig bei Kombination aus Cytokinin und 2,4-D), wobei nur Typ I-Kallus regenerierbar war und 0,2 - 0,8 Sprosse pro Explantat bildete. Die Beschreibungen dieser Kallus-Typen stimmen mit den eigenen Beobachtungen überein. Morsi *et al.*, 2019, dagegen beschreiben indirekte Regeneration in drei von 10 Genotypen der Zuckerrübe auf Kallusinduktionsmedium mit 0,1 mg/l (0,5 µM) BAP mit 2,0 mg/l (10 µM) 2,4-D (maximal 0,4 Adventivsprosse pro Kallus). Da einige der Strube-Genotypen bei Nutzung von BAP und 2,4-D Kallus ausbildeten (Typ I bzw. Typ II), wurden im nächsten Schritt Mischungen der beiden Phytohormone zur Kallusinduktion getestet. Dazu wurden 6 Mischverhältnisse (0,5 µM 2,4-D / 0,1 µM BAP; je 0,5 µM 2,4-D und BAP; 5 µM 2,4-D / 0,1 µM BAP; 5 µM 2,4-D / 0,5 µM BAP; 5 µM 2,4-D / 1 µM BAP und je 5 µM 2,4-D und BAP) eingesetzt. Da nicht der gesamte Umfang der Test-Genotypen verwendet werden konnte, wurden nur diejenigen verwendet, bei denen durch BAP Kallus induziert werden konnte (13 Genotypen). Im Versuch konnte kein Genotyp gefunden werden, der über eine der sechs verschiedenen

BAP/2,4-D-Mischungen einen lockeren, regenerativen Kallus bildet. Bei hoher 2,4-D-Konzentration wurde erneut ein fest am Explantat sitzender Kallus beobachtet.

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von Licht auf die Kallusinduktion geprüft, da Protokolle verschiedener Studien hierbei variieren (Freytag *et al.*, 1988, Gürel *et al.*, 2001, Moghaddam and Taha, 2005, Kagami *et al.*, 2016). Dazu wurde zum einen das Ausgangsmaterial (*in vitro*-Klone) unterschiedlich angezogen und zum anderen wurden die Bedingungen zur Kallusinduktion variiert (ohne Licht im Vergleich zu 16 h Licht / 8 h Dunkel). Da *in vitro*-Klone ohne Licht kaum wachsen, wurde die dauerhafte Dunkelphase nur für 7 Tage verwendet. Da bekannt ist, dass durch Licht u.a. der endogene Hormonhaushalt und das Auxin / Cytokinin - Verhältnis beeinflusst wird, wurde die Kallusinduktion erneut auf 6 verschiedenen Hormonbedingungen durchgeführt, mit entweder ausschließlich Cytokinin (0,5 oder 5 µM BAP), Auxin (0,5 oder 5 µM 2,4-D) oder Mischungen (je 0,5 µM 2,4-D und BAP; 5 µM 2,4-D und 0,5 µM BAP). Dieser Versuch wurde nur mit den vier Ausgangsgenotypen (GT31, 58 und zwei Genotypen der CAU Kiel) durchgeführt. So wie im vorangegangenen Versuch konnte lockerer Kallus am besten durch Verwendung von BAP bei den Genotypen GT31 und GT58 erhalten werden. Die Genotypen aus Kiel induzierten innerhalb der 8 Wochen Inkubation auf den sechs verschiedenen Medien entweder keinen oder nur sehr wenig Kallus. Die Kallusinduktionsrate nimmt besonders bei Petiol-Explantaten mit höherer BAP-Konzentration ab. Zudem konnte festgestellt werden, dass bei GT31 und GT58 im Licht deutlich mehr und etwa eine Woche früher Kallus induziert wird als im Dunklen. Bei der Kallusinduktion im Licht bildete sich ebenfalls lockerer Kallus auf den Auxin-haltigen Medien, der ebenso auf Regenerationsmedien überführt wurde. Neben der beschriebenen Kallusinduktion konnten etwa 2 bis maximal 4 Wochen nach dem Auflegen bei GT31 und den beiden Genotypen der CAU Kiel direkte Regenerate beobachtet werden. Die meisten direkten Regenerate konnten bei einem *B. maritima*-Genotyp (CAU Kiel) aus Petiol-Explantaten auf Medium mit 0,5 µM 2,4-D unter Lichtbedingungen erhalten werden (30% der Explantate mit Regeneraten). Die höchste Regenerationsfrequenz bei GT31 (4% der Explantate) wurde bei Verwendung von Petiol-Explantaten unter Lichtbedingungen auf Medium mit 0,5 µM BAP beobachtet. GT58 zeigte dagegen auf keinem Induktionsmedium direkte Regeneration.

Neben dem in der Gewebekultur am häufigsten verwendeten Nährmedium MS (Murashige and Skoog, 1962), kommt zur Kultivierung von Kallus auch Gamborg B5-Medium (Gamborg *et al.*, 1968) bzw. für die Zuckerrübe insbesondere eine Kombination der MS-Makro- und Mikrosalze mit B5-Vitaminen zum Einsatz (z.B. Freytag *et al.*, 1988, Norouzi *et al.*, 2005). Bei drei Genotypen mit naher Verwandtschaft zu GT58 (einer davon ohne Kallusinduktion auf MS) wurde die Kallusinduktion und Regeneration auf MS-Vollmedium, MS-Medium mit B5-Vitaminen, B5-Vollmedium und B5-Vollmedium mit Zusatz von Caseinhydrolysat verglichen (alle mit 5 µM BAP). Der Genotyp ohne Kallusinduktion auf MS reagiert auch auf den anderen Medien nicht mit der Bildung eines lockeren Kallus. Die Explantate, die auf Medium mit Caseinhydrolysat inkubiert wurden, zeigten sehr schnell Nekrosen und nur wenig Kallusinduktion. Auch die Verwendung des B5-Vollmediums hatte bei allen Genotypen eine reduzierte Kallusinduktionsrate zur Folge. Der Vergleich von MS-Vollmedium mit MS-Medium mit B5-Vitaminen hingegen zeigte ähnliche Ergebnisse bezüglich Kallusinduktion und der indirekten Regeneration. Da

keine Verbesserung erreicht werden konnte, wurde im Folgenden weiter mit MS-Medium (mit MS-Vitaminen) gearbeitet.

Auch bezüglich der Bedingungen für die indirekte Regeneration (im Anschluss an die Kallusinduktion) gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben zur Hormonzusammensetzung. Während Kagami *et al.* (2015) eine Kombination von 1 mg/l BAP, 1 mg/l ABA (Abscisinsäure) und 1 mg/l TIBA (2,3,5-Trijodbenzoesäure) verwenden, wird bei Kong *et al.* (2020) 1 mg/l GA3 (Gibberellinsäure) mit 1 mg/l TDZ (Thidiazuron, wie BAP ein Cytokinin) eingesetzt. Der Vergleich dieser beiden Hormonmischungen bei den Strube-Genotypen zeigte keine eindeutige Präferenz, jedoch konnten homogenere Ergebnisse zur Regeneration auf Medium mit GA3 und TDZ erhalten werden. Da aus bisherigen Versuchen bekannt war, dass BAP nicht nur zur Kallusinduktion, sondern auch zur Regeneration verwendet werden kann, wurde in den nachfolgenden Experimenten GA3 und BAP im Regenerationsmedium verwendet.

Die Kallusinduktion bei Geweben anderer („nicht-rekalzitranter“) Fruchtarten erfolgt i.d.R. durch die Verwendung von Auxinen (am häufigsten 2,4-D). Die Regeneration des dabei gebildeten Kallus wird anschließend durch Reduktion der exogenen Auxin-Konzentration ausgelöst. Die Versuche im Rahmen des Projekts zur Kallusinduktion der Zuckerrübe über Auxine verliefen negativ. Sowohl Kallusinduktion als auch Regeneration der Strube-Genotypen verlaufen über Cytokinin-haltiges Medium unter Licht. Daraus resultiert das Problem, dass diese beiden Prozesse ineinander übergehen und wenig steuerbar sind. Dies kann für weitere methodische Schritte (z.B. Transformation, Applikation von Ribonukleoproteinen) von Nachteil sein, da eine zu früh einsetzende Regeneration zu einem unerwünscht hohen Anteil an nicht-transgenen bzw. nicht mutierten „Escapes“ führen könnte. Zur Untersuchung der Möglichkeit der Steuerung der Regeneration wurde der Zusatz eines Auxin-Synthese-Inhibitors (*L*-Kynurenin) zur Kallusinduktion getestet. *L*-Kynurenin wird bei He *et al.* (2011) als kompetitiver Inhibitor der TAA1/TAR Aktivität (Enzyme der Auxinbiosynthese) und der Ethylenantwort von Wurzeln in *Arabidopsis* beschrieben. Es wurden Klone von Genotypen mit Cytokinin-abhängiger Kallusinduktion (GT31 und GT78) und Klone eines Genotyps ohne bisherige Induktion regenerativen Kallus, aber mit direkter Regeneration (GT83) verwendet. Im Versuch wurden die Klone zunächst vermehrt und anschließend für 4 Wochen auf Vermehrungsmedium mit oder ohne *L*-Kynurenin angezogen. Dann erfolgte die Kallusinduktion (nur Blatt-Explantate) auf MSmT-Medium mit je fünf verschiedenen Hormonzusammensetzungen.

Für die beiden Genotypen, bei denen die Kallusinduktion mittels Cytokinin möglich ist, hatte weder die Vorbehandlung mit *L*-Kynurenin noch dessen Einsatz im Induktionsmedium großen Einfluss auf die Kallusinduktion. Bei Genotyp GT83 konnte auch in diesem Versuch kein Kallus erhalten werden. Die Kombination von *L*-Kynurenin und Auxin führte in keinem der Fälle zu einer effektiven Kallusinduktion. Auch bezüglich der Regeneration hatte die Vorbehandlung der Klone kaum einen Effekt. Für GT31 wirkte sich der Einsatz der hohen Konzentration von *L*-Kynurenin sogar negativ auf die Regeneration aus.

Zusammenfassend zu ST2.1 konnten die Arbeiten zur Erstellung eines effizienten Regenerationssystems erfolgreich abgeschlossen werden (Meilenstein M2.1). Für drei der 25 durch genomweite Markeranalysen vorselektierten Genotypen der Strube Research (GTs 31, 58 und 78) konnte ein geeignetes Protokoll zur indirekten Regeneration herausgearbeitet werden. Die Kallusinduktionsrate lag bei diesen Genotypen zwischen 83-96% sowohl für Blatt- als auch Petiol-Explantate. Die Regenerationseffizienz (Regenerate pro Explantat) der Genotypen variierte von 0,1 bis 1. Dabei wurden nur Regenerate berücksichtigt, die sich *in vitro* zu Pflanzen weiter entwickeln konnten. Die für diese drei Genotypen herausgearbeitete Methodik besteht aus 1) Anzucht von *in vitro*-Klonen auf Vermehrungsmedium, 2) Präparation von Blatt- und Petiol-Explantaten von *in vitro*-Klonen 3) Induktion eines lockeren, regenerativen Kallus auf Cytokinin-haltigem MS-Medium, 4) Transfer des Kallus auf Regenerationsmedium (BAP und GA3) und 5) Isolierung von Regeneraten auf MS-Medium zur Vermehrung (Abbildung 2). Die spätere Bewurzelung der Regenerate durch Einsatz von Auxinen wurde hier noch nicht bearbeitet, da diese für Zuckerrüben i.d.R. kein Problem darstellt (eigene Erfahrung aus der Klonproduktion bei Strube). Darüber hinaus konnte ein weiterer Genotyp (GT83) identifiziert werden, der auf Cytokinin-haltigem MS-Medium zwar keine Kallusbildung zeigt, jedoch eine gute direkte Regeneration insbesondere bei Petiol-Explantaten aufweist (circa 14% der Explantate, Abbildung 2). Mit den vorliegenden Protokollen und den Genotypen können die Arbeiten für ST2.4 begonnen und Arbeitspakete der Projektpartner weitergeführt werden. Dazu wurden bei Strube Research Saatgut und *iv*-Klone vermehrt und für alle Projektpartner bereitgestellt.

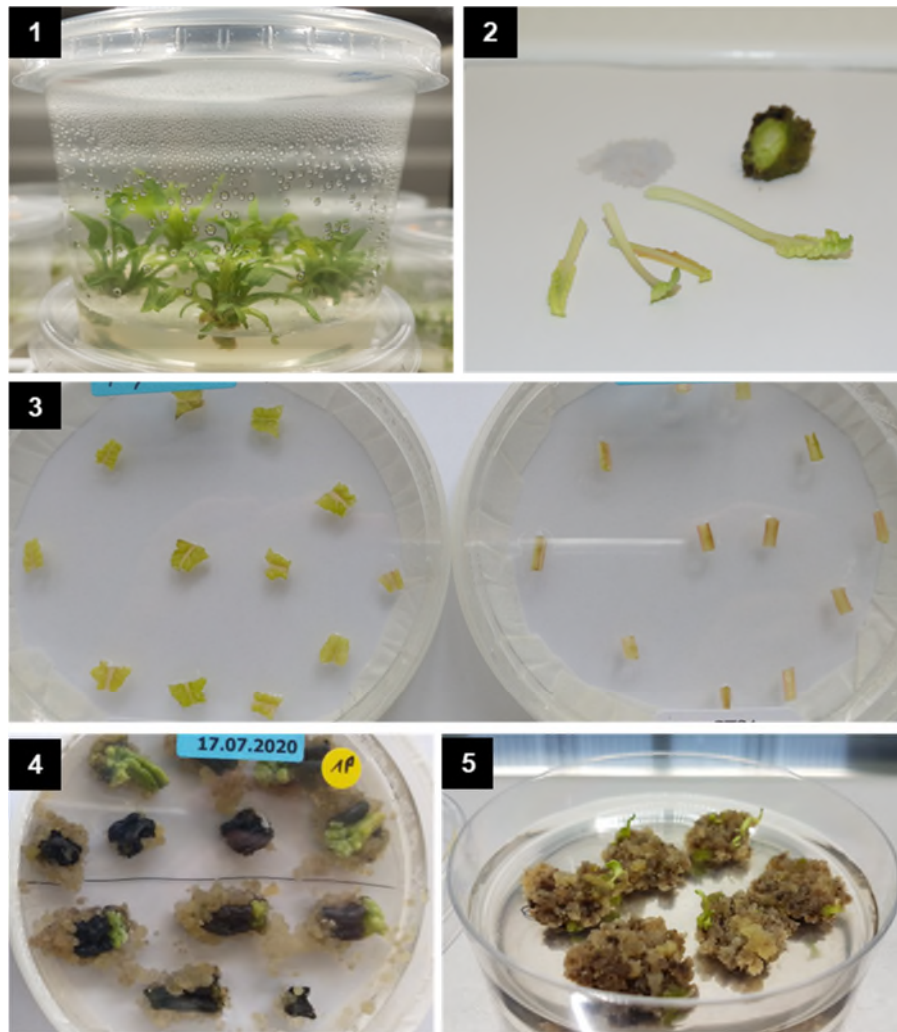


Abbildung 2

Indirekte Regeneration

1) Anzucht von Klonen
in vitro auf
Vermehrungsmedium

2) und 3) Präparation
von Blatt- und Petiol-
Explantaten

4) Induktion eines
lockeren, regenerativen
Kallus auf Cytokinin-
haltigem MS-Medium

5) Regenerierender
Kallus

ST2.2: Etablierung der *Agrobacterium*-Infiltration für Zuckerrübe

Zur Überprüfung der Funktionalität klonierter Plasmide vor einer langwierigen Transformationsprozedur sollte ein transientschneller Schnelltest durch *Agrobacterium*-Infiltration (Agroinfiltration) entwickelt werden. Diese transiente Transformationstechnik wird üblicherweise in der Modelnpflanze *Nicotiana benthamiana* angewendet. Die Prüfung der Funktionalität zielgesteuerter Nukleasen kann jedoch zumeist nur im Zielorganismus selbst stattfinden, da nur dort die zur „guide-RNA“ passende Zielsequenz vorhanden ist. Daher bestand die Aufgabe darin, die *Agroinfiltration* in den gleichen Genotypen der Zuckerrübe zu etablieren, die zur Mutagenese verwendet werden sollen. Da unklar war, ob sich eine *Agrobacterium*-Suspension in Blätter junger Zuckerrüben injizieren lässt und eine transiente Expression stattfindet, wurde zunächst mit Plasmiden gearbeitet, die das Reportergen *beta*-Glucuronidase (*Gus*) unter Regulierung verschiedener Promotoren (*A. tumefaciens* Nopalinsynthase (*nos*)-, Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) 35S- und Ubiquitin-Promotor aus *Arabidopsis* oder *Helianthus*) enthalten (Plasmide erhalten von DNA Cloning Service, Hamburg). Durch Infiltration von Blättern der *B. vulgaris* Genotypen GT58 und GT78 mit Hilfe einer Spritze (Protokoll nach Gils *et al.*, 2012) konnte gezeigt werden, dass eine GUS-Expression durch *Agroinfiltration* für Zuckerrübe möglich ist. Die Expressionsstärke bei Zuckerrüben im direkten Vergleich mit *N. benthamiana* war jedoch deutlich geringer (Abbildung 3).

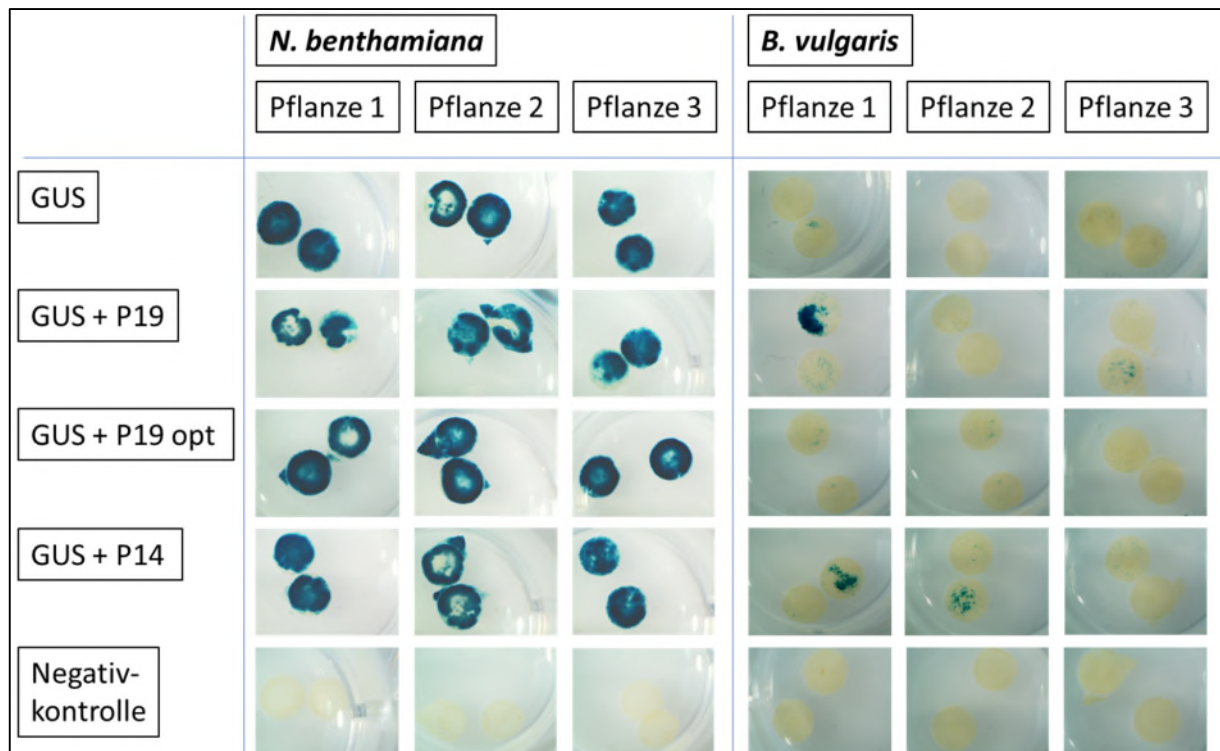


Abbildung 3 Histochemische Analyse infiltrierter Blätter von *N. benthamiana* und *B. vulgaris*. Histochemischer Nachweis des GUS-Proteins in Ausstanzungen von Blättern, die mit *A. tumefaciens* mit einem GUS-Binärplasmid ohne Silencing-Suppressor (GUS) infiltriert oder zusätzlich mit *A. tumefaciens*-Stämmen mit folgenden Silencing-Suppressoren co-infiltriert wurden: P19 des TBSV (GUS + P19), für *B. vulgaris* codon-optimiertes P19 des TBSV (GUS + P19 opt) oder P14 des BNYYV (GUS + P14). Die Abbildung zeigt Ausstanzungen des jeweils ersten von insgesamt drei infiltrierten Blättern einer Pflanze. Als Negativkontrollen wurden Ausstanzungen von nicht-infiltrierten Blättern der gleichen Pflanze verwendet.

Die Ursache der vergleichsweise geringen Transgenexpression ist nicht bekannt. Es wurde vermutet, dass Silencing-Prozesse der Zuckerrüben dazu führen könnten, dass die Expression reduziert wird. Für die *Agroinfiltration* von *N. benthamiana* werden häufig sogenannte Silencing-Suppressoren eingesetzt, um die Expression zu verstärken (Lombardi *et al.*, 2009; Tsuda *et al.*, 2012; Vazquez-Vilar *et al.*, 2016). Im nächsten Schritt wurden daher drei Plasmide kloniert, die Sequenzen der durch Gensynthesen (Eurofins) erzeugten viralen Silencing-Suppressoren unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors enthielten. Die verwendeten Silencing-Suppressoren waren das P19 des Tomato Bushy Stunt Virus (TBSV), ein für *B. vulgaris* Codon-optimiertes P19 (TBSV) und das P14 des in Zuckerrüben Rizomania verursachenden Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYYV, Isolat F75). Diese Plasmide wurden mit den das Reportergen enthaltenden Plasmiden in Zuckerrübenblätter co-infiltriert (1:1 Mischung der *A. tumefaciens*-Stämme vor Infiltration). In den insgesamt vier Versuchen zur Optimierung der Agroinfiltration der Zuckerrüben, bei denen auch die klonierten viralen Silencing-Suppressoren getestet wurden, konnte kein deutlicher Einfluss auf die GUS-Aktivität beobachtet werden (Abbildung 4). Auch andere Faktoren hatten keinen wesentlichen positiven Einfluss auf die Expression des Transgens (z.B. optische Dichte der Bakterienkultur oder Zugabe von Acetosyringon zum Infiltrationspuffer). Tendenziell war jedoch ein jüngeres Alter der Pflanzen zum Zeitpunkt der Infiltration (5-6 Wochen) von Vorteil und einer der Genotypen (GT78) zeigte eine tendenziell höhere Expression. Die Bedingungen während der

Kultivierung erwiesen sich ebenfalls als wichtig (Kulturschrank, hohe relative Luftfeuchtigkeit, 16 h Licht bei 22°C, Nachtabenkung auf 18°C).

ST2.3: Entwicklung eines transienten Nuklease-Schnelltests

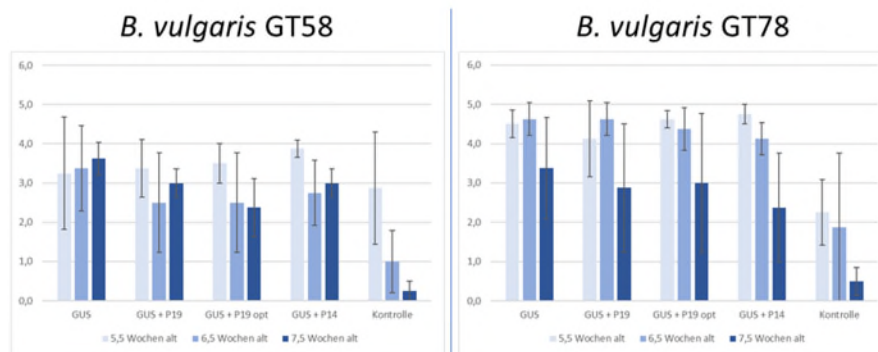


Abbildung 4 Optische Auswertung histochemischer Analysen infiltrierter Blätter. Die Auswertung der histochemisch gefärbten Blattausstanzungen erfolgte mittels Binokulars mit einem Bewertungsmaßstab von 0-5 mit jeweils mindestens 4 Wiederholungen.

- 0= keine Färbung
- 1= kaum sichtbare Färbung
- 2= gut sichtbar, geringe Färbung
- 3= gut sichtbar, mittelstarke Färbung
- 4= deutliche Färbung, nicht homogen
- 5= komplett eingefärbt

Das in ST2.2 etablierte Protokoll zur Agrobacterium-Infiltration wurde anschließend für Versuche zur Genomeditorierung eingesetzt, um die Funktionalität von Endonukleasen vor einer stabilen Transformation oder Transfektion prüfen und darüber hinaus auch die Effizienz verschiedener Endonukleasen oder gRNAs vergleichen zu können. Dazu wurden von den Projektpartnern aus Kiel drei verschiedene Plasmide mit Target Sites in Exon 3 (T1), Exon 4 (T2) bzw. Exon 5 (T3) des Blühinduktionsgens *BvBTC1* und aus Hamburg zwei Plasmide (mit und ohne kodierender Sequenz für ein *Cell-Penetrating Peptide*, CPP) mit zwei Target Sites (T1 in Exon 1, T2 in Exon 3) eines Nematodenanfälligkeitgens (*Nematode Susceptibility Locus*, *NSL*) zur Verfügung gestellt (s. Berichte der CAU Kiel und der Universität Hamburg). Diese Plasmide wurden zur Agrobacterium-Infiltration des GT78 zunächst in den *A. tumefaciens* Stamm (GV3101) transformiert. Die Hälfte der Pflanzen wurde ebenfalls mit dem Silencing Suppressor P19 co-infiltriert. Nach erfolgter Infiltration (3 Tage oder mehrere Zeitpunkte) wurden Ausstanzungen angefertigt und die Gesamt-DNA isoliert. Anschließend wurden die Target Sites amplifiziert, sequenziert (Sanger-Sequenzierung, Microsynth AG, Balgach, Schweiz) und die erhaltenen Sequenzen auf Sequenzvariationen / Mutationen überprüft.

Nur bei einem der sequenzierten PCR-Produkte der infiltrierten Pflanzen konnte eine vom „Wildtyp“-Allel abweichende Sequenz beobachtet werden, die allerdings über eine Sequenzierung mit dem reversen Primer nicht bestätigt werden konnte. Insertionen oder Deletionen in der Zielregion wurden ebenfalls nicht gefunden. Aufgrund der beschriebenen Temperaturabhängigkeit der Wirksamkeit von Endonukleasen in Pflanzen (LeBlanc *et al.*, 2018, Milner *et al.*, 2020) wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, bei dem die Pflanzen nach Infiltration bei 30°C oder 37°C bis zu sechs Tage inkubiert wurden (Probenahme bei 3 und 6 Tagen nach Infiltration). Auch in diesem Versuch konnte weder über

Gelelektrophorese (Untersuchung auf PCR-Fragmentlängenpolymorphismen zum Nachweis von Insertionen oder Deletionen) noch über Sequenzierung ein Nachweis einer Genom-Editierung in den Zielregionen erbracht werden.

In Arbeitspaket ST2.2 wurde festgestellt, dass die Transgenexpression in infiltrierten Zuckerrübenblättern im Vergleich zur Modellpflanze *N. benthamiana* eher gering ist. Um zu prüfen, ob eine Expression der Endonuklease-Plasmide stattfindet, wurde eine weitere Infiltration durchgeführt, zu zwei Zeitpunkten nach Infiltration RNA isoliert und mittels RT-qPCR auf das Endonuklease-Transkript analysiert. In den Proben von 2 aus 3 untersuchten Pflanzen konnte die Expression aufgrund von DNA-Hintergrund vermutlich durch unzureichenden DNase-Verdau der RNA-Proben (Sequenzen der Endonukleasen ohne Intron) nicht zweifelsfrei festgestellt werden. In einer Pflanze (in allen drei infiltrierten Blättern) konnte die Expression der Endonuklease jedoch nachgewiesen werden. Daher wurden PCR-Proben aus infiltrierten Blättern zusätzlich mittels Amplikon-Sequenzierung über NGS untersucht (GENEWIZ, Leipzig). Die Proben konnten sinnvoll in 10 Pools vereint werden (jeweils die drei Proben einer Pflanze und stets beide Ziel-Sequenzen zusammen), um Kosten zu sparen. Die durchschnittliche Lesedichte betrug etwa 100.000 Reads pro Probe. Insgesamt wurden 6.505.089 Reads für alle Pools erreicht. Der mittlere „Quality Score“ über die gesamte Länge der Amplikons (339 bp bzw. 405 bp) lag zwischen 37,17 und 37,38 und der prozentuale Anteil an Basen mit einem „Quality Score“ über 30 lag zwischen 96,16 und 97,19. Dies spricht für eine gute Qualität der Analysen. Die Datenverarbeitung bei Strube wurde mit Hilfe der Software CLC Genomics (Qiagen) durchgeführt werden. Es konnte jedoch kein Hinweis auf Mutagenese gefunden werden. Die Basen im Zielbereich entsprachen zu deutlich über 99% der erwarteten Wildtyp-Sequenz. Die gleichen Werte wurden auch in nicht-behandelten Proben erhalten. Somit konnte über GUS-Assays bzw. RT-qPCR zwar die Expression des Reportergens bzw. der Endonuklease nach Agrobacterium-Infiltration in Zuckerrüben nachgewiesen, aber keine Genomeditierung festgestellt werden.

ST2.4: Entwicklung eines *Agrobacterium*-gestützten Transformationssystems

Einer der wichtigsten Vorteile der Genomeditierung durch Endonukleasen gegenüber der klassischen Gentechnik ist die Möglichkeit zur Anwendung transgenfreier Methoden. Dies ist möglich, da die veränderten Eigenschaften des editierten Organismus auf der erzeugten Mutation, nicht aber auf der dauerhaften Aktivität der Endonuklease selbst beruhen. Das CRISPR/Cas-System dient somit als ein biotechnologisches Werkzeug. Dennoch wird zur Anwendung von CRISPR/Cas in Pflanzen häufig der Weg der stabilen Integration der Endonukleasen beschrieben. In verschiedenen Fruchtarten konnte bereits die hohe Effizienz dieser Methodik bestätigt werden (Hisano *et al.*, 2021, Feng *et al.*, 2014, Pan *et al.*, 2016, Tian *et al.*, 2018). Eine weit verbreitete, kostengünstige Methode ist die *Agrobacterium*-gestützte Transformation, die zudem i.d.R. zu einer eher geringen Anzahl an Insertionen des Transgens führt. Dies ist von Vorteil, da die zuvor eingeführte CRISPR/Cas- (Fremd-) DNA zur Erstellung transgenfreier Pflanzen durch Kreuzung wieder aus der Pflanze entfernt werden muss. Auch für Zuckerrübe sind Protokolle zur *Agrobacterium*-gestützten Transformation publiziert. Prinzipiell können diese nach der verwendeten Regenerationsmethode unterschieden werden. Eine indirekte Regeneration (mit Kallusphase) wird bei Kong *et al.*, 2020, Kagami, 2015, und Kishchenko *et al.*, 2005,

verwendet. Diese Protokolle haben gemeinsam, dass der Kallus zunächst (aus Explantaten von Keimlingen oder Sprosskulturen) induziert und isoliert wird und erst im Anschluss transformiert und regeneriert wird. Bei Kagami, 2015, wird nicht durchweg auf festem Medium gearbeitet, sondern zunächst eine Suspensionskultur angelegt, in der auch die Co-Kultivierung erfolgt. Zur Regeneration werden die Kalli wieder auf festes Medium überführt.

Zunächst wurde das Transformationsprotokoll nach Kong *et al.*, 2020, getestet, das an Kishchenko *et al.*, 2005, angelehnt ist. Verwendet wurden in ST2.1 selektierte Genotypen mit guter Kallusinduktion und indirekter Regeneration und der gleiche *Agrobacterium*-Stamm wie in ST2.2 (GV3101). Dieser Stamm wurde bei Kishchenko *et al.*, 2005 und 2011, verwendet, während bei Kagami, 2015, mit LBA4404 und bei Kong *et al.*, 2020, mit AGL-1 gearbeitet wurde. Da zunächst die Etablierung des Protokolls und die Effizienz der Transformation im Vordergrund standen, wurde das gleiche Reportergenplasmid wie in ST2.2 eingesetzt (AtUbq10::GUS; P35S::nptII, wobei das Selektionsmarkergen Neomycin-Phosphotransferase II (NPTII) Resistenz u.a. gegen Paromomycin bewirkt). Da die Handhabung der Kalluskulturen während der Co-Kultivierung und insbesondere das Spülen der Zellen nach erfolgter Transformation technisch problematisch waren, wurden insgesamt drei Versuche mit je zwei bis vier Genotypen durchgeführt. In Kurzform besteht die Methodik aus folgenden Schritten: a) Anzucht von *in vitro*-Klonen auf Vermehrungsmedium, b) Präparation von Blatt- und Petiol-Explantaten der Klone, c) Induktion eines lockeren, regenerativen Kallus auf Cytokinin-haltigem MS-Medium, d) Entnahme des Kallus einer Petrischale und Infektion mit Agrobakterien, e) Co-Kultivierung auf festem Medium für 3-5 Tage, f) Spülen des Kallus mit Timentin-haltigem Medium und Kultivierung für 3-4 Wochen auf Selektionsmedium, g) Transfer wachsender Kalli auf frisches Selektionsmedium und h) Isolierung von Regeneraten auf MS-Medium zur Vermehrung (Abbildung 5).

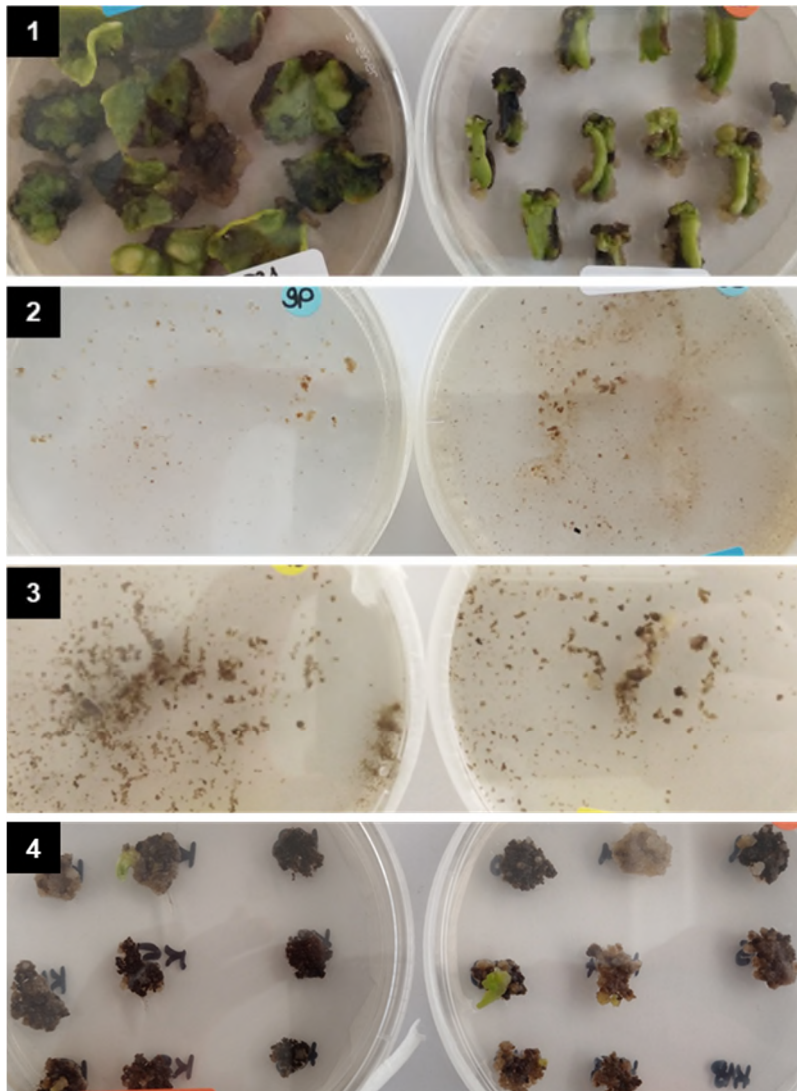


Abbildung 5 Agrobacterium-gestützte Transformation

- 1) Induktion eines lockeren, regenerativen Kallus auf Cytokinin-haltigem MS-Medium
- 2) Kallus nach Co-Kultivierung und Spülen auf Selektionsmedium
- 3) Kalluskultur nach 3 Wochen auf Selektionsmedium
- 4) Regenerierender Kallus auf Selektionsmedium

Es waren deutliche Unterschiede zwischen den drei verwendeten Genotypen sichtbar. Während die Kalli des GT31 nach Co-Kultivierung auf Selektionsmedium nur wenig anwuchsen, zeigte der Kallus der Genotypen GT58 und GT78 ein deutlich besseres Wachstumsverhalten nach Co-Kultivierung (Tabelle 2). In allen Fällen erholt sich Blattkallus schneller als der des Petiols. Da nur wenige Kalli auf Selektion anwuchsen, wurden beim ersten Transfer auch nicht wachsende Kalli auf frisches Selektionsmedium aufgesetzt und der weitere Verlauf beobachtet. In den meisten Fällen war eine Erholung des Kallus in den nachfolgenden Kulturfolgen sichtbar. Der Kallus wurde dabei zur Regeneration insgesamt dreimal in einem 2-wöchigen Rhythmus auf frisches, selektives Medium transferiert und die Regenerate in Bechern mit Selektionsmedium isoliert. Auffällig war, dass die Kalluskulturen der Kontrollen ohne Binärplasmid auf Paromomycin-haltigem Medium ähnlich gut wuchsen wie diejenigen mit Binärplasmid. Zum Nachweis der Transformation und zur Abschätzung der Selektionseffizienz nach erfolgter Transformation wurde der Kallus einer histochemischen Untersuchung bezüglich des GUS-Transgens unterzogen. Da der GUS-Assay das Absterben der Zellen zufolge hat, erfolgte dieser erst nach Abschluss der Regeneration (9 Wochen nach Transformation). Die Ergebnisse der histochemischen Analyse sind in Abbildung 6 und Tabelle 2 dargestellt und zeigten teilweise gute Transformationsfrequenzen. Auch bezüglich der Regeneration verhalten sich die Genotypen

unterschiedlich, wobei die meisten Regenerate von GT78 und die wenigsten von GT58 erhalten werden konnten. Die histochemische Analyse von Blattmaterial und PCR-Untersuchungen der Regenerate ergab, dass es sich in allen Fällen um Ausreißer handelte. Es konnten keine transgenen Pflanzen erhalten werden. Zusammen mit den Ergebnissen der histochemischen Analysen der Kalli erscheint die gewählte Konzentration des Paromomycins als nicht ausreichend und es sollten weitere Tests zur Anpassung der Selektionsbedingungen erfolgen. Da anfänglich je nach Genotyp lediglich maximal etwa 65% der Kalli anwachsen und eine zunehmende Erholung der Kalli eintrat, erscheint ein graduelles Anheben der Konzentration bei jedem Transfer am sinnvollsten.

GT	Explantat	Binär-plasmid	Wachstumsrate der Kalli nach Co-Kultivierung*			Kallus-Transformationsfrequenz**			Regenerationsfrequenz***
			V1	V2	V3	V1	V2	V3	V3
31	Blatt	Ohne	0	25%	40%	0	0	0	0
31	Blatt	P35S::GUS	22%	50%	41%	11%	50%	43%	0
31	Petiol	Ohne	0	0	33%	0	0	0	0
31	Petiol	P35S::GUS	0	37%	34%	0	44%	32%	0
58	Blatt	Ohne	50%	40%	n.a.	0	0	n.a.	n.a.
58	Blatt	P35S::GUS	53%	20%	n.a.	100%	50%	n.a.	n.a.
58	Petiol	Ohne	25%	40%	n.a.	0	0	n.a.	n.a.
58	Petiol	P35S::GUS	0	29%	n.a.	50%	25%	n.a.	n.a.
78	Blatt	Ohne	100%	n.a.	57%	0	n.a.	0	17%
78	Blatt	P35S::GUS	53%	n.a.	64%	14%	n.a.	23%	58%
78	Petiol	Ohne	0	n.a.	44%	0	n.a.	0	0
78	Petiol	P35S::GUS	0	n.a.	44%	0	n.a.	13%	96%

Tabelle 2 Zusammenfassung der ersten Versuchsreihe (V1-V3) zur Agrobacterium-gestützten Transformation.

* Die Kalli der Kontrollen (ohne Binärplasmid) wurden auf Selektionsmedium kultiviert.

** Bezieht sich auf die Anzahl der Kalli mit histochemischer Färbung unabhängig von der Menge des gefärbten (transgenen) Anteils pro Probe (vgl. Abb. 7).

*** Zahl der aus Kalli gebildeten Sprossregenerate im Verhältnis zur Gesamtzahl der Kalli. Es ist nur die Regenerationsfrequenz des dritten Versuchs (V3) angegeben, da die Regenerate in den Versuchen V1 und V2 wegen Infektion mit Agrobacterium nicht bewertet werden konnten. Es wurden nur vitale Regenerate nach mindestens einem Transferzyklus auf Vermehrungsmedium (3-4 Wochen) berücksichtigt.

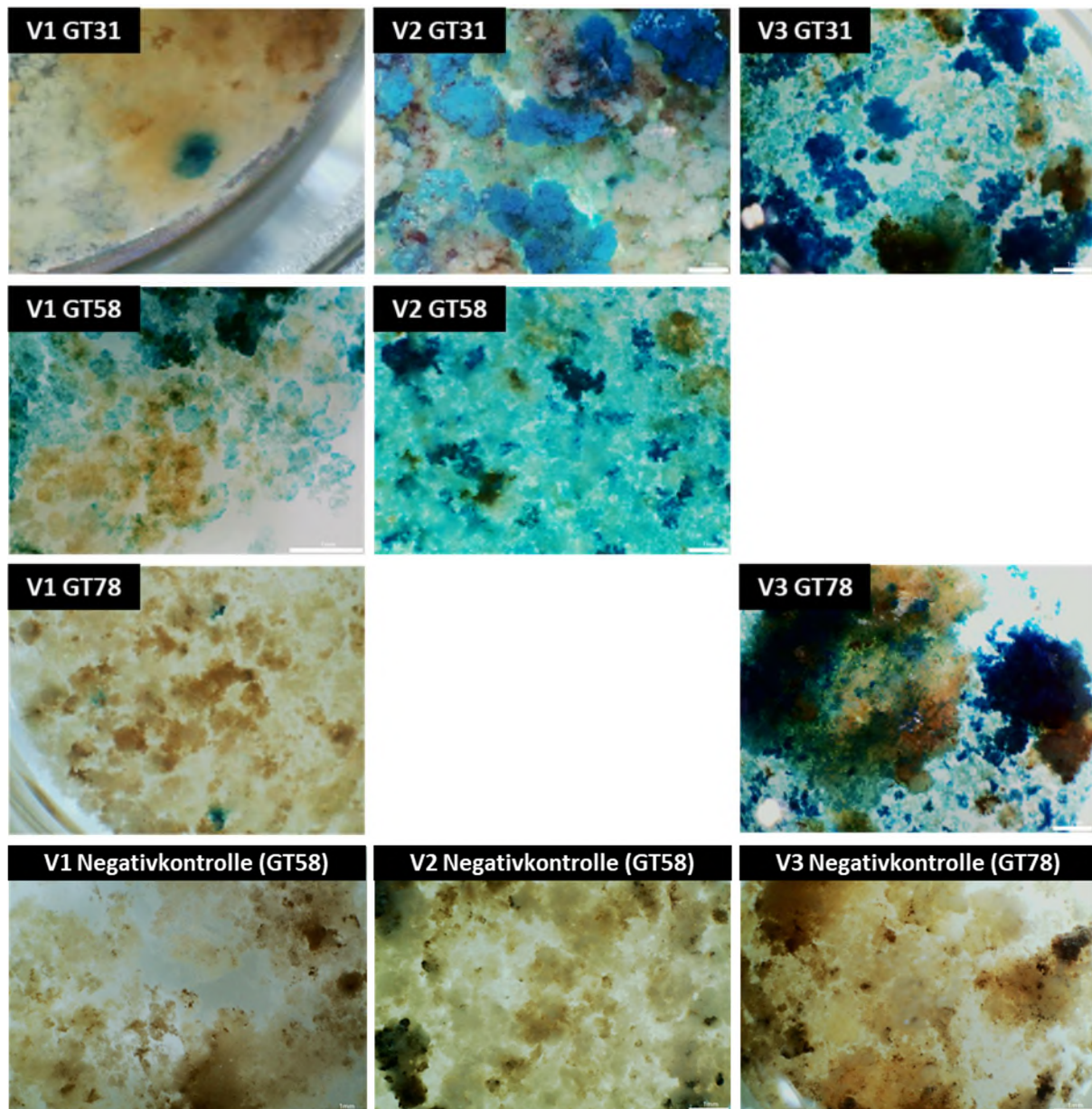


Abbildung 6 Beispiele histochemischer Analysen transformierter Blattkalli der Versuche V1-V3.

Basierend auf den Erfahrungen der ersten drei Versuche wurde eine weitere Transformation von Kalluskulturen der drei Genotypen durchgeführt. Dabei wurde ein Teil erneut mit dem GUS-Plasmid (AtUbq10::GUS; P35S::nptII) und ein Teil mit dem in ST2.3 verwendeten Plasmid mit der Endonuklease und zwei sgRNAs (NSL) transformiert. Die Ergebnisse der Transformation sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Die Selektionsbedingungen wurden für diesen Versuch noch nicht geändert, d.h. die Konzentration an Paromomycin war die gleiche wie in den ersten Versuchen. Auch in diesem Versuch lag die maximale Wachstumsrate der Kalli nach Transformation und Waschen bei etwa 65% und variierte stark zwischen Genotyp und Explantattyp. Der Einfluss des Paromomycins auf den nicht-transformierten Kontrollkallus war insbesondere bei den Genotypen GT58 und GT78 eher gering. Die Transformationsfrequenz der Kalluskulturen (ähnlich wie in Abbildung 6) war besonders für GT58 allerdings niedriger als in den vorangegangenen Versuchen (maximal 44%). Insgesamt konnten 5 Regenerate des GT31 und 26 Regenerate des GT78 aus Transformationsversuchen mit Binärplasmid

erhalten werden. Bei GT58 konnten erneut keine Regenerate isoliert werden. GUS- und PCR-Analysen ergaben auch in diesem Versuch, dass alle Regenerate nicht-transgen (Ausreißer) waren.

GT	Explantat	Binär-plasmid	Selektions-medium	Wachstums-rate nach Co-Kultivierung	Kallus-Transformations-frequenz* (Anzahl analysierter Kalli)	Regenerations-frequenz** (Anzahl Regenerate)
31	Blatt	Ohne	Nein	67%	0	0
31	Blatt	Ohne	Ja	40%	0	0
31	Blatt	P35S::GUS	Ja	33%	19% (16)	0
31	Blatt	Endo-NSL	Ja	60%	-	25% (3)
31	Petiol	Ohne	Nein	57%	0	0
31	Petiol	Ohne	Ja	0	0	0
31	Petiol	P35S::GUS	Ja	40%	33% (24)	8% (2)
31	Petiol	Endo-NSL	n.a.	-	-	-
58	Blatt	Ohne	Nein	50%	0	0
58	Blatt	Ohne	Ja	43%	0	0
58	Blatt	P35S::GUS	Ja	54%	0	0
58	Blatt	Endo-NSL	Ja	50%	-	0
58	Petiol	Ohne	Nein	50%	0	0
58	Petiol	Ohne	Ja	67%	0	0
58	Petiol	P35S::GUS	Ja	33%	17% (12)	0
58	Petiol	Endo-NSL	Ja	44%	-	0
78	Blatt	Ohne	Nein	40%	0	33% (1)
78	Blatt	Ohne	Ja	40%	0	0
78	Blatt	P35S::GUS	Ja	14%	12,5% (8)	108% (13)
78	Blatt	Endo-NSL	Ja	0	-	25% (3)
78	Petiol	Ohne	Nein	33%	0	67% (2)
78	Petiol	Ohne	Ja	0	0	0
78	Petiol	P35S::GUS	Ja	14%	44% (9)	42% (5)
78	Petiol	Endo-NSL	Ja	0	-	42% (5)

Tabelle 3 Ergebnisse der Agrobacterium-gestützten Transformation mit Reportergen- und Endonuklease-Konstrukten. Für den Versuch wurden je 12 Petrischalen für das GUS- und das Endonuklease-Plasmid und je 3 Petrischalen für Kontrollen ohne Plasmid eingesetzt (mit jeweils 12 Explantaten pro Petrischale). Eine Ausnahme war der Petiolkallus von GT31, bei dem 24 Petrischalen für das GUS-Plasmid und keine für das Endonuklease-Plasmid eingesetzt wurden.

* Bezieht sich auf die Anzahl der Kalli mit histochemischer Färbung unabhängig von der Menge des gefärbten (transgenen) Anteils pro Probe.

** Zahl der aus Kalli gebildeten Sprossregenerate im Verhältnis zur Gesamtzahl der Kalli. Es wurden nur vitale Regenerate nach mindestens einem Transferzyklus auf Vermehrungsmedium (3-4 Wochen) berücksichtigt.

Da ein Teil der mit dem GUS-Plasmid transformierten Kalli transgen war (histochemischer Nachweis), wurden von Kalli, die mit dem Endonuklease-Binärplasmid transformiert worden waren, DNA extrahiert und amplifizierte Proben der Zielsequenzen analog zu ST2.3 einer Amplikon-Sequenzierung über NGS unterzogen. Auch in diesem Fall wurden die Proben aus Kostengründen sinnvoll gepoolt, um Kosten zu sparen. Die durchschnittliche Lesedichte lag bei dieser Analyse bei etwa 90.000 Reads pro Probe. Insgesamt wurden 7.244.456 Readpaare aus 15 Pools erhalten. Der mittlere „Quality Score“ über die gesamte Länge lag zwischen 37,27 und 37,5 und der prozentuale Anteil an Basen mit „Quality Score“ über 30 lag zwischen 96,48 und 97,58. Trotz der guten Qualität der Analysen konnte auch hier kein Hinweis auf Mutagenese gefunden werden.

Auch Transformationsmethoden mit direkter Regeneration sind für Zuckerrübe publiziert (z.B. Lindsey und Gallois, 1990, Konwar, 1994, Joersbo *et al.*, 1998, Mishutkina *et al.*, 2010, Norouzi *et al.*, 2005). Da

in mehreren Publikationen mit erfolgreicher Transformation das Protokoll von Norouzi *et al.*, 2005, angewendet wurde (Jafari *et al.*, 2009, Mohammadzadeh *et al.*, 2012 und 2015), sollte das Verfahren mit einem Genotyp von Strube mit guter direkter Regeneration aus Petiol-Explantaten getestet werden (GT83, s. Ergebnisse aus ST2.1). Die Transformationsmethode besteht aus folgenden Schritten: 1) Etablierung von Sprosskulturen aus Samen, 2) Transfer der Sprosse auf Vermehrungsmedium, 3) Isolieren von Blättern und Transfer auf Vermehrungsmedium (in Petrischalen), 4) Induktion von Sprossen entlang der Mittelrippe der Blätter, 5) Abtrennen der induzierten Sprosse (nicht benötigt) und Isolierung der Blätter mit Sprossbasisgewebe, 6) Transformation der Sprossbasis-Explantate mit *A. tumefaciens* Stamm GV3101 durch Inokulation für einige Minuten, 7) Co-Kultivierung für 3 Tage bei gedimmtem Licht, 8) Spülen der Explantate mit Antibiotika-haltigem Medium und 9) Transfer auf Selektionsmedium zur Sprossregeneration. Die Sprosse sollen für eine Periode von 60 Tagen mit mehrfachem Transfer auf Selektionsmedium selektiert und anschließend bewurzelt und getopft werden. Insgesamt wurden 47 Klone auf dem Medium nach Norouzi *et al.*, 2005, und zehn Klone auf dem bei Strube verwendeten Standardmedium für die Anzucht und Vermehrung von Sprosskulturen angezogen. Das Vermehrungsmedium von Norouzi *et al.*, 2005, enthält eine andere Vitaminmischung (B5-Vitamine), das Cytokinin BAP in einer höheren Konzentration und zusätzlich ein Auxin, 3-Indolbuttersäure (IBA). Anschließend wurden je 9 Blätter isoliert und auf dem jeweiligen Medium inkubiert. In beiden Fällen zeigen etwa 60% der Blätter Sprossbildung. Im Falle des Mediums mit IBA konnten jedoch deutlich mehr Sprosse isoliert werden (durchschnittlich 1,4 Sprosse pro Explantat im Vergleich zum Medium ohne IBA mit 0,9 Sprossen/Explantat). Die Anzahl der Triebe schwankte sehr stark zwischen den einzelnen Klonen. Eine Korrelation zur Blattgröße konnte jedoch nicht gefunden werden. Die Explantate, die Sprosse gebildet hatten, wurden zur *Agrobacterium*-Transformation mit dem GUS-Binärplasmid verwendet und anschließend für drei Wochen auf Paromomycin-haltiges Medium gesetzt (100 mg/l Paromomycin). Etwa die Hälfte der Explantate bildete auf diesem Medium neue Sprosse aus, die nach zwei Wochen zur Selektion in Becher mit Paromomycin-haltigem Vermehrungsmedium transferiert wurden. Nahezu alle Klone überlebten die Selektion. AChlorose oder Wachstumsreduktionen waren kaum erkennbar. Daher wurden die Klone erneut transferiert und gleichzeitig Blattproben entnommen. Der histochemische Nachweis der GUS-Aktivität zeigte zwar Blaufärbungen in einigen der Blätter, jedoch handelte es sich nur um wenige Zellen (s. Abbildung 7). Es scheint daher möglich, dass die Konzentration des Paromomycins nicht hoch genug war. Für die folgende Selektion wurden die Klone vermehrt und auf zwei verschiedene Selektionsmedien aufgesetzt (100 mg/l Kanamycin oder 150 mg/l Paromomycin). Auch nach dieser Selektion war das Wachstum der Klone kaum von dem der Kontrollen und auch untereinander zu unterscheiden. Es wurden erneute Blattproben entnommen, wobei der histochemische Nachweis nach dieser Selektion keine GUS-Aktivität mehr zeigte. Bei Norouzi *et al.*, 2005, wurde zur Selektion der Explantate 150 mg/l Kanamycin eingesetzt, wobei bis zu 23% resistente Sprosse erhalten wurden. Bei Jafari *et al.*, 2009, Mohammadzadeh *et al.*, 2012 und 2015, wurden 50 mg/l Kanamycin verwendet und 35% bzw. 46-60% resistente Sprosse erhalten. Im zweiten Schritt, der Selektion bereits regenerierter Sprosse, wurde die Konzentration auf 100 mg/l Kanamycin erhöht bzw. erniedrigt. Die Selektion führte zu einer weiteren Reduktion der resistenten Sprosse auf 20-25%, von denen weniger als die Hälfte gemäß PCR- bzw. Southern Blot-Analyse positiv waren.

Medium	Binärplasmid	Anzahl Explantate	Selektion der Explantate mit Sprossbildung	Selektion der Sprosse	GUS-positive Signale*
Standard	ohne	22	13 (59%)	12 (92%)	0
Standard	P35S::GUS	26	8 (31%)	8 (100%)	5 (63%)
Norouzi <i>et al.</i> , 2005	ohne	54	27 (50%)	26 (96%)	0 (alle getestet)
Norouzi <i>et al.</i> , 2005	P35S::GUS	378	191 (51%)	189 (99%)	46 (185 getestet) (25%)

Tabelle 4 Transformation nach Norouzi *et al.*, 2005

* Die Färbung beschränkte sich in allen Fällen auf einen kleinen Teil der Blattgewebe. Beispiele siehe Abb. 8.



Abbildung 7 Beispiele histochemischer Analysen transformierter Blätter (Protokoll nach Norouzi *et al.*, 2005).

Aufgrund der komplexen Herausforderungen bezüglich der Pflanzenregeneration der Zuckerrübe wurde eine weitere publizierte Methode, die fast vollständig ohne Gewebekultur durchgeführt wird, getestet (Wu *et al.*, 2015). Für diese Methode werden Samen der Zuckerrübe oberflächensterilisiert und Keimlinge auf Vermiculit mit Flüssigdünger angezogen. Kurz nach Entfaltung der Keimblätter werden die Keimlinge zur Transformation verwendet. Dazu wird das apikale Nodium herausgetrennt und die Wunde mit einem mit *A. tumefaciens* getränkten Wattebausch abgedeckt. Die behandelten Keimlinge werden für drei Stunden im Dunkeln inkubiert und der Wattebausch danach entfernt. Anschließend werden die Pflanzen im Gewächshaus für weitere 3-4 Wochen angezogen. Innerhalb der ersten Woche bildet sich ein neues Nodium, aus dem ein oder mehrere neue Sprosse wachsen (s. Abbildung 8). Bei Strube wurde die Kulturführung in einem Lichtschrank und statt mit Vermiculit in Kokosquelltabs durchgeführt. Die Flüssigdüngung wurde durch Topfen in Erde mit Langzeitdünger ersetzt. Die neu gebildeten Pflanzentriebe wurden einer histochemischen Analyse auf GUS-Aktivität unterzogen. Bei Trieben mit mehr als 3 cm Länge wurde nur der untere Teil und ein Teil der Spitze getestet. Es konnte jedoch keine Färbung beobachtet werden.



Abbildung 8 Ausbildung neuer Nodien nach Abtrennung des apikalen Nodiums.

Anhang

Literaturverzeichnis

- Feng, Z. et al. Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 4632–4637 (2014).
- Freytag, A. H., Anand, S. C., Rao-Arelli, A. P. & Owens, L. D. An improved medium for adventitious shoot formation and callus induction in *Beta vulgaris* L. *in vitro*. *Plant Cell Reports* 7, 30–34 (1988).
- Gamborg, O. L., Miller, R. A. & Ojima, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50, 151–158 (1968).
- Gils, M., Rubtsova, M. & Kempe, K. Split-Transgene Expression in Wheat. in *Transgenic Plants* (eds. Dunwell, J. M. & Wetten, A. C.) vol. 847 123–135 (Humana Press, 2012).
- Gürel, S., Gürel, E. & Kaya, Z. Callus Development and Indirect Shoot Regeneration from Seedling Explants of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Cultured In Vitro. *Turk J Bot* 25, 25–33 (2001).
- He, W. et al. A Small-Molecule Screen Identifies I-Kynurenine as a Competitive Inhibitor of TAA1/TAR Activity in Ethylene-Directed Auxin Biosynthesis and Root Growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 23, 3944–3960 (2011).
- Hisano, H., Abe, F., Hoffie, R. E. & Kumlehn, J. Targeted genome modifications in cereal crops. *Breed. Sci.* 71, 405–416 (2021).
- Jafari, M. et al. Enhanced resistance to a lepidopteran pest in transgenic sugar beet plants expressing synthetic cry1Ab gene. *Euphytica* 165, 333–344 (2009).
- Joersbo, M. et al. Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. *Molecular Breeding* 4, 111–117 (1998).
- Kagami, H. et al. Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.). in *Agrobacterium Protocols* (ed. Wang, K.) vol. 1223 335–347 (Springer New York, 2015).
- Kagami, H. et al. Efficient callus formation and plant regeneration are heritable characters in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Hereditas* 153, 12 (2016).
- Kempe, K., Higashi, Y., Frick, S., Sabarna, K. & Kutchan, T. M. RNAi suppression of the morphine biosynthetic gene *salAT* and evidence of association of pathway enzymes. *Phytochemistry* 70, 579–589 (2009).
- Kishchenko, E., Komarnitskii, I. & Kuchuk, N. Production of transgenetic sugarbeet (L.) plants resistant to phosphinothricin. *Cell Biology International* 29, 15–19 (2005).
- Kong, J. et al. Overexpression of the Transcription Factor GROWTH-REGULATING FACTOR5 Improves Transformation of Dicot and Monocot Species. *Front. Plant Sci.* 11, 572319 (2020).
- Konwar, B. K. *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Genetic Transformation of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.). *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 3, 37–41 (1994).
- LeBlanc, C. et al. Increased efficiency of targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 in plants using heat stress. *Plant J* 93, 377–386 (2018).
- Lindsey, K. & Gallois, P. Transformation of Sugarbeet (*Beta vulgaris*) by *Agrobacterium tumefaciens*. *J Exp Bot* 41, 529–536 (1990).
- Lindsey, K., Gallois, P. & Eady, C. Regeneration and transformation of sugarbeet by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Tissue Culture Manual B7*, 1–13 (1991).

- Lombardi, R. et al. High-level HIV-1 Nef transient expression in *Nicotiana benthamiana* using the P19 gene silencing suppressor protein of Artichoke Mottled Crinckle Virus. *BMC Biotechnol* 9, 96 (2009).
- Milner, M. J., Craze, M., Hope, M. S. & Wallington, E. J. Turning Up the Temperature on CRISPR: Increased Temperature Can Improve the Editing Efficiency of Wheat Using CRISPR/Cas9. *Front. Plant Sci.* 11, 583374 (2020).
- Mishutkina, Ya. V., Kamionskaya, A. M. & Skryabin, K. G. The creation of sugar beet transgenic plants expressing bar gene. *Appl Biochem Microbiol* 46, 80–86 (2010).
- Moghaddam, B. E. & Taha, R. M. Cellular behavior in embryogenic and non-embryogenic sugar beet calluses. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 41, 465–469 (2005).
- Mohammadzadeh, R. et al. Agrobacterium tumefaciens-mediated introduction of polygalacturonase inhibiting protein 2 gene (PvPGIP2) from *Phaseolus vulgaris* into sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *AJCS* 6, 1290–1297 (2012).
- Mohammadzadeh, R. et al. Generation of transgenic sugar beet (*Beta vulgaris* L.) overexpressing the polygalacturonase inhibiting protein 1 of *Phaseolus vulgaris* (PvPGIP1) through Agrobacterium-mediated transformation. *Turk J Agric For* 39, 429–438 (2015).
- Morsi, N. A. A., El-Gabry, Y. A. & Abu-Ellail, F. F. B. Indirect Regeneration Tissue Culture and Molecular Characterization for Some Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Genotypes. *Middle East J. Agric. Res.* 8, 187–199 (2019).
- Murashige, T. & Skoog, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* 15, 473–497 (1962).
- Norouzi, P., Malboobi, M. A., Zamani, K. & Yazdi-Samadi, H. Using a competent tissue for efficient transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 41, 11–16 (2005).
- Pan, C. et al. CRISPR/Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plants in the first and later generations. *Sci Rep* 6, 24765 (2016).
- Tian, S. et al. Engineering herbicide-resistant watermelon variety through CRISPR/Cas9-mediated base-editing. *Plant Cell Rep* 37, 1353–1356 (2018).
- Tomita, K., Hiura, S. & Tamagake, H. Evaluation of the potential for somatic embryogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) breeding lines and improvement of regeneration efficiency. *Plant Biotechnology* 30, 479–487 (2013).
- Tsuda, K. et al. An efficient Agrobacterium-mediated transient transformation of *Arabidopsis*: An efficient transient transformation. *The Plant Journal* 69, 713–719 (2012).
- Vazquez-Vilar, M. et al. A modular toolbox for gRNA–Cas9 genome engineering in plants based on the GoldenBraid standard. *Plant Methods* 12, 10 (2016).