

Neue Züchtungstechniken



DLG-Mitgliedschaft. Wir geben Wissen eine Stimme.



Jetzt Mitglied werden!

Die DLG ist seit mehr als 130 Jahren offenes Netzwerk, Wissensquelle und Impulsgeber für den Fortschritt.

Mit dem Ziel, gemeinsam mit Ihnen die Zukunft der Land-, Agrar- und Lebensmittelwirtschaft zu gestalten.

www.DLG.org/Mitgliedschaft



DLG-Merkblatt 468

Neue Züchtungstechniken

Autoren

- Dr. Andreas Stahl, Julius Kühn-Institut, Quedlinburg
- Matthias Tann, Garbsen
- Ulrike Amoruso-Eickhorn, Bundesverband Deutscher Pflanzenzüchter e.V., Bonn
- Dr. Alexander von Chappuis, DLG e.V., Frankfurt am Main

unter Mitwirkung des DLG-Ausschusses für Pflanzenzüchtung,
Sortenwesen & Saatgut

Die Autoren danken Dr. Markus Gierth, BDP, und Dr. Frank Hartung, JKI, für wertvolle Anregungen und Hinweise.

Titelbild: DLG (Adobe Stock, Emoji Smileys People, xamtiw, vrx123, picoStudio)

Alle Informationen und Hinweise ohne jede Gewähr und Haftung

Herausgeber:

DLG e.V.
Fachzentrum Landwirtschaft
Eschborner Landstraße 122, 60489 Frankfurt am Main

1. Auflage, Stand: 11/2021

© 2022

Vervielfältigung und Übertragung einzelner Textabschnitte, Zeichnungen oder Bilder (auch für den Zweck der Unterrichtsgestaltung) sowie Bereitstellung des Merkblattes im Ganzen oder in Teilen zur Ansicht oder zum Download durch Dritte nur nach vorheriger Genehmigung durch DLG e.V., Servicebereich Marketing, Eschborner Landstraße 122, 60489 Frankfurt am Main, Tel. +49 69 24788-209, M.Biallowons@DLG.org

Inhalt

1. Einleitung (Rahmenbedingungen und Hintergrund)	5
2. Der Phänotyp (= Erscheinungsbild) als Ergebnis von Umwelt (U) und Genotyp (G)	6
3. Mutationen – essentiell für biologische Vielfalt und die Voraussetzung der Pflanzenzüchtung	6
4. Züchtung ist Evolution im Zeitraffer	7
5. Zuchtziele	7
6. Einordnung der neuen Züchtungstechniken	8
7. Die Funktionsweise von Genome Editing am Beispiel von CRISPR/Cas9	10
8. Nutzen von Genome Editing in der Pflanzenzüchtung – Genome Editing im Vergleich	13
8.1 Klassische zeitaufwändige Kreuzungsschritte zur Implementierung neuer Eigenschaften aus einem Wildtyp	13
8.2 Physikalische/chemische Mutagenese	15
8.3 Die Gentechnik wie wir sie bisher kannten	15
9. Verschiedene Varianten des CRISPR-Systems	16
10. Welche Voraussetzungen müssen erfüllt sein, damit ein Züchter Genome Editing anwenden kann?	17
10.1 Kenntnis über die Zielgene	17
10.2 Platzierung der Komponenten	17
10.3 Lizenzrechte	18
11. Nachweisbarkeit	18
11.1 Identifizierbarkeit des Mutationsursprungs	18
11.2 Off-target-Effekte	18
12. Gegenwärtige Entwicklungen zur Regulierung	19

1. Einleitung (Rahmenbedingungen und Hintergrund)

Damit die Versorgung der Bevölkerung mit Nahrungsmitteln gesichert werden kann, sind Lösungen gefragt, die die Wirtschaftlichkeit der Landwirtschaft nicht überfordern und Ökonomie und Ökologie in Einklang bringen.

Überlegungen zu langfristigen Zielen in der Agrarpolitik stehen in verschiedenen Diskussions- bzw. Strategiepapieren. Hier seien die „Farm to Fork-Strategie“ (frei übersetzt: vom „Hof auf den Tisch“) auf EU-Ebene und in Deutschland die „Ackerbaustrategie 2035“ sowie der Abschlussbericht der Zukunftskommission Landwirtschaft beispielhaft genannt. Darin werden Anhaltspunkte für eine nachhaltige Landwirtschaft und den Transformationsprozess künftiger Agrar- und Ernährungssysteme diskutiert:

- „Eckpfeiler“ in der Strategie Farm to Fork sind, den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln nach Menge und Risiko um 50 % und den Anteil an Düngereinsatz um 20 % zu reduzieren sowie den Anteil an Ökolandbau auf 25 % auszubauen und auf den Flächen die Artenvielfalt um 20 % zu erhöhen. Diese Ziele sollten bis 2030 umgesetzt werden.
- Die „Ackerbaustrategie 2035“ des Bundeslandwirtschaftsministeriums beschreibt 12 Handlungsfelder (Nr. 5: Pflanzenzüchtung), die konkretere Maßnahmen zu einer nachhaltigeren und ressourcenschonenderen Gestaltung des Ackerbaus entlang von 6 Leitlinien vorschlagen. U. a. hebt das BMEL die Bedeutung neuer Züchtungsmethoden für die Verbesserung von Effizienz-, Resistenz- und Toleranzeigenschaften hervor.
- Die Zukunftskommission Landwirtschaft hat im Juli 2021 ihren Abschlussbericht vorgelegt und darin der Landwirtschaft „Systemrelevanz“ attestiert. Sie stellt fest, dass neue Züchtungsmethoden unter geeigneten Voraussetzungen das Potenzial haben, zur effektiveren Sortenentwicklung und damit zu mehr Nachhaltigkeit im Agrar- und Ernährungssystem beizutragen. Dazu zählt eine differenzierte Bewertung der Methoden auf Grundlage der vorgenommenen Veränderung und der möglichen Auswirkungen der eingesetzten Verfahren. Die ZKL spricht sich u. a. auch für eine Regulierung inkl. Risikoprüfung und Zulassung neuer Züchtungstechniken aus, wobei das Vorsorgeprinzip zu berücksichtigen ist.

Die umweltpolitischen Rahmenbedingungen werden durch den „Green Deal“ der Europäischen Union einen Einfluss auf die landwirtschaftliche Produktion und Tierhaltung haben. Bis zum Jahr 2050 soll die Europäische Union klimaneutral werden. Die EU-Kommission reagiert mit dem „Green Deal“ auf die wachsenden Risiken, die Klimawandel und Artensterben für die Volkswirtschaften mit sich bringen. Man möchte die Ressourcen Wasser, Luft, Böden, Wälder und Meere sowie das Klima in einem guten Zustand erhalten.

Für die Umsetzung der gesellschaftlichen Anforderungen – speziell im Pflanzenbau – kommt der Pflanzenzüchtung eine besondere Bedeutung zu. Sie soll Sorten entwickeln, die in den Bereichen Nährstoffeffizienz, Resistenzen gegen Krankheiten und Schädlinge sowie bessere Widerstandsfähigkeit gegen abiotischen Stress eine Lösung für die Landwirtschaft und somit auch für die Gesellschaft liefern. Mit Sorten, die hohe Erträge liefern können und eine gewisse Ertragssicherheit bieten, leisten die Pflanzenzüchter einen großen Beitrag. Gleichzeitig sichern Züchter mit ihrem Schaffen eine biologische Vielfalt.

2. Der Phänotyp (= Erscheinungsbild) als Ergebnis von Umwelt (U) und Genotyp (G)

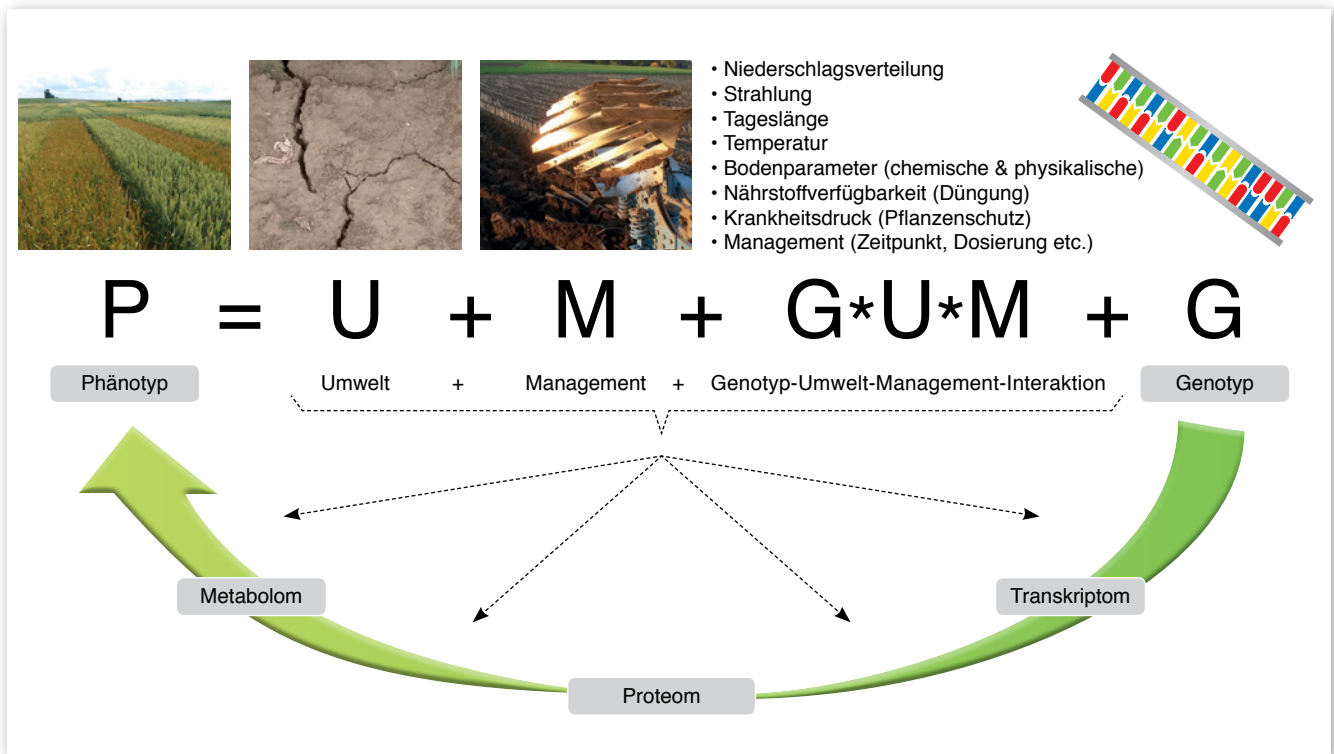


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Informationsflusses vom Genotyp zum Phänotyp, inkl. komplexer Wechselwirkungen

Die DNA (Desoxyribonukleinsäure) ist der Träger der gesamten Erbinformation. Sie besteht aus einer spezifischen Abfolge von vier verschiedenen Nukleotiden, die sich in einem Doppelstrang gegenüberstehen. Die Abfolge der Nukleotide, auch Nukleotidsequenz genannt, bestimmt die Aminosäuresequenz, aus denen Proteine aufgebaut sind. Die Proteine erfüllen die unterschiedlichsten Aufgaben in der Pflanze (z. B. als Enzyme, Speicherproteine). Durch die nahezu unendliche Zahl der Kombinationsmöglichkeiten, die durch die Abfolge der Nukleotide entsteht, ist die DNA-Sequenz hoch spezifisch (vgl. genetischer Fingerabdruck). Das Zusammenwirken aller Proteine in einer Pflanze prägt den Stoffwechsel und schließlich im Zusammenwirken mit der Umwelt und weiteren Faktoren das gesamte Erscheinungsbild, den Phänotyp (Abbildung 1). Entlang dieser Kaskade führen Veränderungen der DNA, so genannte Mutationen, zu unterschiedlichen Merkmalsausprägungen.

3. Mutationen – essentiell für biologische Vielfalt und die Voraussetzung der Pflanzenzüchtung

Wird an einer bestimmten Stelle der DNA ein Nukleotid durch ein anderes ausgetauscht, entsteht eine Punktmutation und es kann zu einer veränderten Aminosäuresequenz kommen und gegebenenfalls auch zu einer modifizierten Aktivität oder Funktionalität der Proteine. In der Natur entstehen solche Mutationen mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit rein zufällig, man spricht daher von Spontanmutationen. So kann bspw. davon ausgegangen werden, dass im Erntegut von einem Hektar Weizen durchschnittlich jede Stelle des Genoms mindestens einmal spontan mutiert vorliegt. Das Entstehen von Mutationen kann aber auch durch höhere Dosierungen von radioaktiver Strahlung, durch bestimmte

chemische Substanzen oder durch künstliche UV-Strahlung provoziert werden. Das Auftreten von Mutationen ist die Grundvoraussetzung für genetische Variation und für Biodiversität auf allen Ebenen, innerhalb und zwischen Arten. Einige Mutationen gehen mit der Ausprägung wünschenswerter Eigenschaften, wie z. B. einer Resistenz, einher. Beispiele für agronomisch bedeutsame Mutationen lassen sich in Resistenzgenen finden. So können punktuelle oder strukturelle Veränderungen der DNA dazu beitragen, dass eine Sorte resistent oder anfällig wird.

4. Züchtung ist Evolution im Zeitraffer

Mutationen bilden also die Voraussetzung bzw. den Motor für die Evolution. Immer wenn sich die veränderten Eigenschaften von einer Pflanze als positiv herausgestellt haben und die Pflanzen damit einen Vorteil gegenüber der nicht-mutierten Varianten hatten, konnten sie sich durchsetzen. Varianten mit nachteiligen Mutationen sterben mit der Zeit aus. In Abhängigkeit der Auswirkungen der Mutation findet also eine natürliche Selektion statt. Das gleiche Prinzip liegt der Pflanzenzüchtung zugrunde. Zuchtprogramme folgen zumeist dem Prinzip, nach einer initialen Schaffung und/oder Neukombination von genetischer Variation, die gewünschten Nachkommen zu selektieren, weiter zu vermehren und schließlich als Sorte anzumelden. Vereinfacht gesagt, folgt ein Zuchtprogramm ähnlichen Grundprinzipien wie die Evolution.

Schon seit mehreren tausend Jahren selektieren Menschen solche Nachkommenschaften von Pflanzen, die ihren Bedürfnissen am ehesten entsprechen. Dadurch wurden Pflanzenpopulationen über tausende Jahre gezielt gelenkt und nicht der zufälligen/natürlichen Entwicklung überlassen. Zwischen Menschen und Nutzpflanzen besteht daher eine enge Ko-Evolution.

Nach und nach wurde die Züchtung immer zielgerichteter. So werden Kreuzungen heute gezielt geplant, um Merkmale zu kombinieren. Klassische Beispiele hierfür sind die Kreuzungen von resistenten Sorten mit solchen, die sich durch hohe Qualitätseigenschaften auszeichnen, mit dem Ziel, resistente und ertragreiche/hochqualitative Nachkommen zu finden, die dann als neue Sorte mit verbesserten Sorteneigenschaften zur Verfügung stehen. Die Palette der Merkmale hat sich erst kürzlich – auch durch spezifischeres Wissen – enorm erweitert und erstreckt sich von Ertrag, qualitätsgebenden Inhaltsstoffen über sämtliche Aspekte der biotischen und abiotischen Stresstoleranz.

Allerdings ist die Entwicklung neuer Sorten eine langwierige Angelegenheit; die Entwicklung einer neuen Sorte bis zur Marktreife dauert ca. 10–15 Jahre. Bereits heute hat ein Züchter die Möglichkeit, diesen Zeitraum mit hohem Aufwand ein wenig zu verkürzen: beispielsweise durch gleichzeitiges Züchten auf der anderen Seite der Erdhalbkugel in frühen Generationen, dem Einsatz von Doppelhaploidentechnik oder Züchten im Gewächshaus mit mehreren Generationen pro Jahr.

5. Zuchtziele

Pflanzenzüchtung hat, neben Düngung und Pflanzenschutz, die **Erträge** der einzelnen Kulturarten maßgeblich erhöht. Auch in Zukunft ist dieses Merkmal ein sehr wichtiges Zuchtziel. Dazu rückt die **Ertragssicherheit** zunehmend in den Fokus. Pflanzenzüchtung schafft Sorten, die abhängig von der Witterung, oder auch unter schwankenden klimatischen Bedingungen, im Ertragsaufbau unterschiedliche Ertragskomponenten ausbilden und damit zu Ertragssicherheit beitragen können.

Neben der Ertragsleistung sind **qualitative Inhaltsstoffe** auch in der Zukunft wichtige Zuchtziele. Pflanzenzüchter haben in unterschiedlichen Kulturarten schädliche Inhaltsstoffe züchterisch entfernt – und gewünschte Inhaltsstoffe hinzugefügt, z. B. Erucasäure bei Raps, reduzierter Glutengehalt bei Weizen oder veränderte Ölqualität bei der Sojabohne.

Um hohe Erträge zu ermöglichen, ist ein „natürlicher“ Schutz vor Krankheiten und Schädlingen oder Schaderregern gewünscht. Pflanzen haben verschiedene Verteidigungsmechanismen, um sich gegen Pilze, Schädlinge und Schaderreger zu schützen. Pflanzenzüchter nutzen diese Mechanismen, um die Widerstandskraft der Pflanze breiter und noch effektiver zu machen.

Bei der Widerstandskraft der Pflanze gegen **Krankheiten** spricht man von Resistenzen bzw. Toleranzen. Hier hat die Pflanzenzüchtung bereits große Erfolge für sich verzeichnet, da heutige Sorten gut mit Abwehrmechanismen gegen verschiedene Blatt- und Ährenkrankheiten ausgestattet sind. Als weitere Beispiele können genannt werden: Resistenzen gegen Schädlinge (Weizengallmücke, Nematoden ...) und Schaderreger (Viren: z. B. Gelbmosaikresistenz bei der Gerste oder Gelbverzweigung, Bakterien: z. B. Bakterienbrand bei Steinobst). Diese Resistenzen und Toleranzen gebündelt mit einer gezielten Anwendung von Pflanzenschutzmitteln, basierend auf dem Schadschwellenprinzip, führen bereits heute zu einer Reduktion der Aufwandmengen chemischer Pflanzenschutzmittel im Sinne des integrierten Pflanzenschutzes. Zusätzlich führen Fruchtfolgegestaltung, technischer Fortschritt in der Applikationstechnik sowie Nutzung digitaler Systeme zu einer weiteren Reduktion.

Neue Herausforderungen können durch veränderte **Klimabedingungen** auftreten. Durch den Klimawandel werden bislang weniger bekannte Krankheiten und auch Schädlinge auf dem Vormarsch sein. Hier kann die Züchtung mittelfristig einen Beitrag leisten.

Die primäre Aufnahme von **Nährstoffen** erfolgt (mit Ausnahme von Kohlenstoff und Sauerstoff) über die Pflanzenwurzel. Aus diesem Grund sind die Zusammenhänge zwischen Wurzelwachstum, Bodengefüge (abhängig von der Bodenart) sowie Mikroorganismen im Boden von großer Bedeutung. Daher beobachten Pflanzenzüchter die wissenschaftlichen Ergebnisse genau und setzen in der Züchtung einen Fokus auf ein verbessertes Wurzelwachstum, was auch unter schwierigen Bedingungen eine verbesserte Nährstoffaufnahme ermöglicht.

Pflanzenzüchtung – rückblickend betrachtet – kann bis heute viele Erfolge verzeichnen. Das gibt Zuversicht, dass sie Lösungen auch für zukünftige Herausforderungen anbieten wird. In Deutschland werden ca. 115 verschiedene Kulturarten züchterisch bearbeitet. Der Hauptfokus liegt dabei auf Kulturarten, die in der Anbaufläche eine gewisse Bedeutung haben. Denn die Landwirte bauen die Kulturarten an, die nachgefragt werden und somit veräußert werden können.

6. Einordnung der neuen Züchtungstechniken

Damit die Pflanzenzüchtung ihrer besonderen Aufgabe gerecht werden kann, nämlich Sorten zu entwickeln, die in den Bereichen Nährstoffeffizienz, Resistenzen gegen Krankheiten und Schädlinge sowie bessere Resilienz gegen biotischen und abiotischen Stress eine Lösung für die Landwirtschaft und somit auch für die Gesellschaft zu liefern, sind neben den verbesserten Methoden der klassischen Züchtung auch die modernen Züchtungsmethoden ergänzend notwendig.

Die neuen molekularen Züchtungstechniken bilden den Sammelbegriff für verschiedene Verfahren, die auch als Genome Editing bzw. neue Molekularbiologische (Züchtungs-)Techniken (NMT) bezeichnet

werden. Darunter fallen die Verfahren CRISPR/Cas, Oligonukleotid gerichtete Mutagenese (ODM), TALEN und Zinkfinger Nukleasen (ZFN), wobei heute vor allem TALEN und mit großem Abstand CRISPR/Cas bevorzugt werden. Base Editing ist die neuste unter den Verfahren (s. u.). Sie alle verbindet das Prinzip, an einer spezifischen Stelle im Genom gezielte Modifikationen der DNA-Sequenz vorzunehmen.

Bei vielen der Verfahren¹ wird in einem ersten Schritt der DNA-Strang an einer bestimmten Stelle getrennt (Doppelstrangbruch, siehe Abschnitt „Die Funktionsweise von Genome Editing“) und in einem zweiten Schritt wieder repariert und dabei manchmal verändert. Mit Hilfe der Verfahren können sehr unterschiedliche Modifikationen der DNA erreicht werden. Viele Anwendungen führen nur zu sehr kleinen Veränderungen von einem bis wenigen Nukleotiden (siehe Mutationen). Es können aber auch ganze DNA-Abschnitte ausgetauscht oder eingefügt werden. Entsprechend des Eingriffsgrades werden die Verfahren in drei Kategorien (Abbildung 2) unterteilt:

SDN 1 – Reparatur des Doppelstrangbruches erfolgt allein durch die zelleigene Ausstattung

SDN 2 – Reparatur erfolgt mit einer Reparaturvorlage, die im Vergleich zur Ursprungssequenz nur gering verändert ist.

SDN 3 – Reparatur erfolgt mit einer Reparaturvorlage, die Gene der eigenen Art oder Fremdgene enthält.

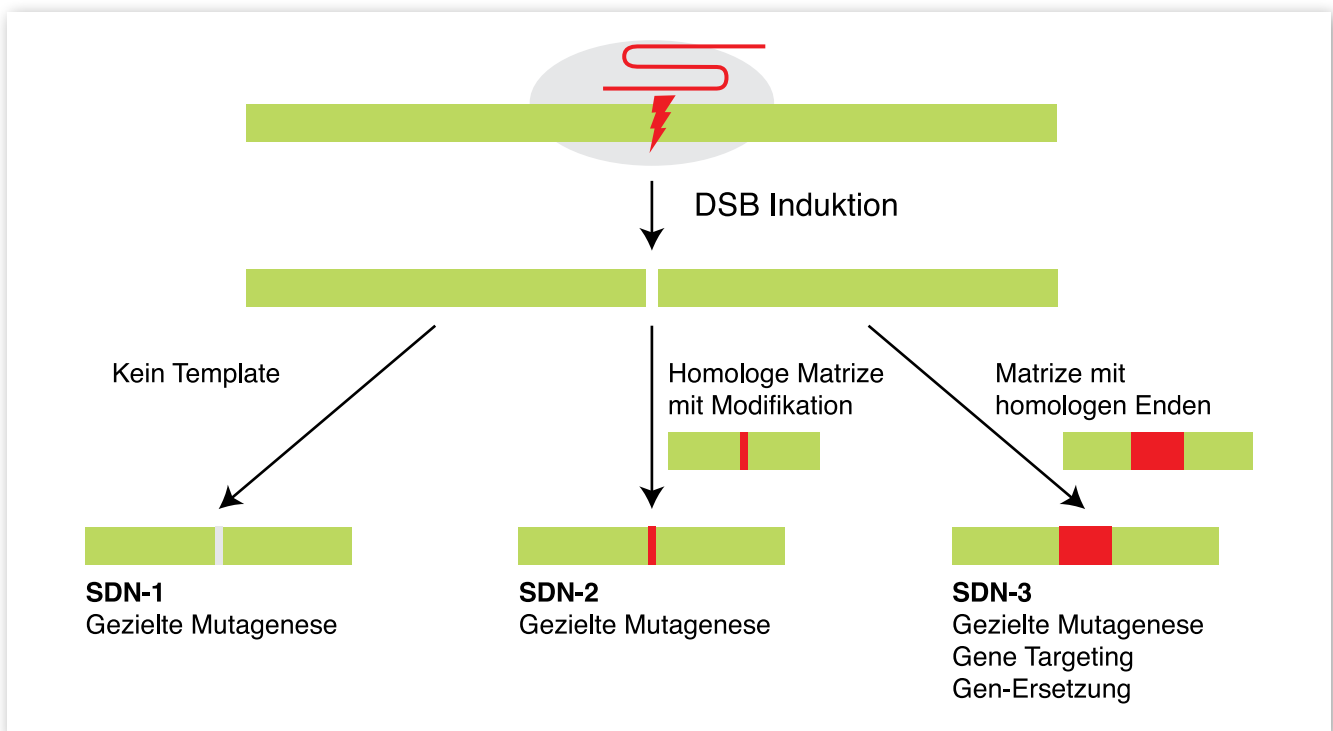


Abbildung 2: Kategorien des Genome Editing (Quelle: www.botanik.kit.edu/garten/276.php#gallery-3, eigene Darstellung)

Die Entdeckung von CRISPR/Cas9 – wie wir vom Abwehrsystem der Bakterien gegen Viren lernen, das Erbgut von Pflanzen zu verändern.

Am Beispiel von CRISPR/Cas9 soll das Funktionsprinzip der neuen Züchtungstechniken verdeutlicht werden. CRISPR steht für *Clustered regularly interspaced palindromic repeats* (ein regelmäßiges

¹ Nicht so bei ODM und Base Editing

clusterartiges Auftreten von palindromischen² Wiederholungen) und ist ursprünglich aus dem Immunsystem von bestimmten Bakterien bekannt. Wenn diese von einem Virus befallen werden, welches schädlich/tödlich für das Bakterium ist, integriert das Bakterium einen Erbgutabschnitt des Virus in seine eigene DNA. Damit baut sich das Bakterium ein immunologisches Gedächtnis auf und merkt sich, welche Viren es bereits befallen haben. Wird das Bakterium von dem gleichen Virus erneut befallen, wird der CRISPR/Cas9-Komplex aktiv und zerschneidet das virale Erbgut, so dass das Virus im Bakterium keinen Schaden mehr anrichten kann. Das CRISPR/Cas9-System ist demnach keine Erfindung des Menschen, sondern hat seine Ursprünge in der Natur selbst. Für die Entdeckung dieser Mechanismen erhielten Emmanuelle Charpentier und Jennifer Doudna 2020 den Nobelpreis für Chemie.

7. Die Funktionsweise von Genome Editing am Beispiel von CRISPR/Cas9

Modellhaft ist in Abbildung 3 der Doppelstrang der DNA, bestehend aus einer Sequenz von vier Nucleotiden (in Farben) dargestellt.

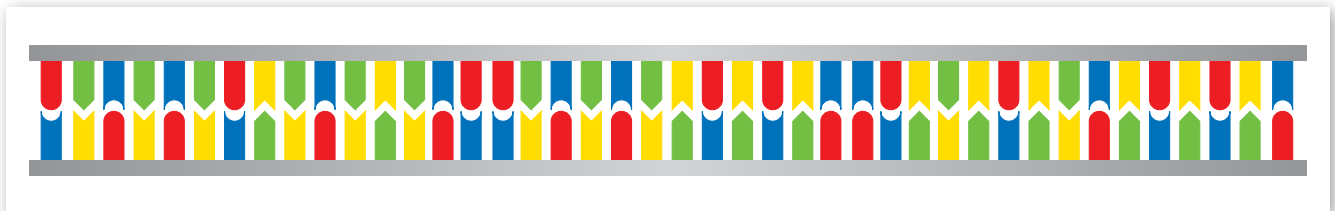


Abbildung 3: Modellhafte Darstellung eines DNA-Doppelstrangs

Für die Editierung werden zwei Moleküle benötigt. Einerseits das namensgebende Enzym Cas9, welches später die DNA schneiden wird, und andererseits ein RNA-Molekül, welches das Cas9-Enzym an die Stelle im Erbgut dirigiert, an der die DNA geschnitten werden soll. Aufgrund der „Lotsenfunktion“ der RNA trägt sie den Namen guideRNA (kurz: gRNA, engl. to guide → lotsen). Wichtig für die Fähigkeit der gRNA ist, dass ihre Sequenz komplementär zu dem DNA-Abschnitt der Pflanze ist, in dem die Editierung durchgeführt werden soll. Um aktiv zu werden, benötigt das Cas9-Enzym ebenfalls eine kurze Nucleotidsequenz (PAM, siehe unten) in der Nähe des Wirkorts. Cas9 und die gRNA verbinden sich und bilden den so genannten gRNA/Cas9-Komplex. Dieser streift wie ein „Scanner“ an der Pflanzen-DNA entlang, bis die genau zur gRNA passende/komplementäre DNA-Stelle gefunden wurde (Abbildung 4a). Wenn zusätzlich vor der Zielsequenz noch eine bestimmte Sequenz von 2 bestimmten Nucleotiden vorhanden ist (die sogenannte PAM-Sequenz), dann ist der Wirkort von Cas9 gefunden (Abbildung 4b). Nun beginnt das Enzym Cas9 mit seiner Arbeit – die DNA wird geschnitten und es kommt damit zum Doppelstrangbruch (Abbildung 4c).

Jeder Organismus ist bestrebt, Brüche in seiner DNA schnell durch zelleigene Enzyme zu reparieren; so auch in der Pflanze. Die beiden DNA-Bruchstücke werden wieder zusammengefügt. Dabei kommt es zu spontanen Fehlern (aufgrund des Doppelstrangbruches fehlt – anders als beim Einzelstrangbruch – die Orientierung). Dieser Reparaturmechanismus wird deshalb als nicht-homologe End-

² Ein Palindrom ist eine bestimmte Abfolge, die – von beiden Seiten gelesen – die gleiche Information enthält (z. B. ANNA oder OTTO).

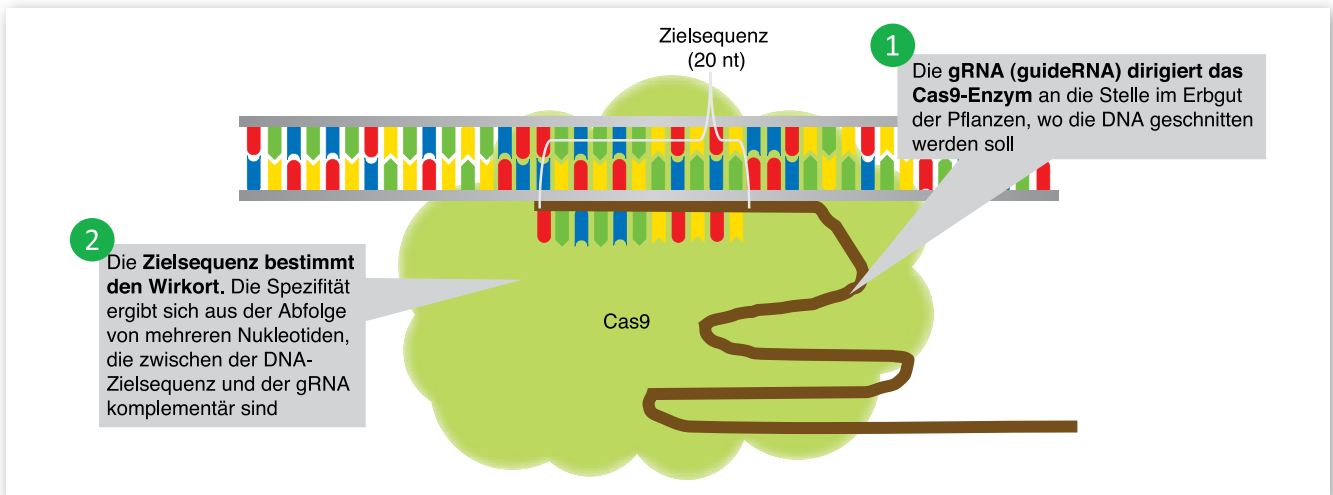


Abbildung 4a: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips von CRISPR/Cas9. Der Komplex aus gRNA und Cas9 bindet an der Zielsequenz der DNA.

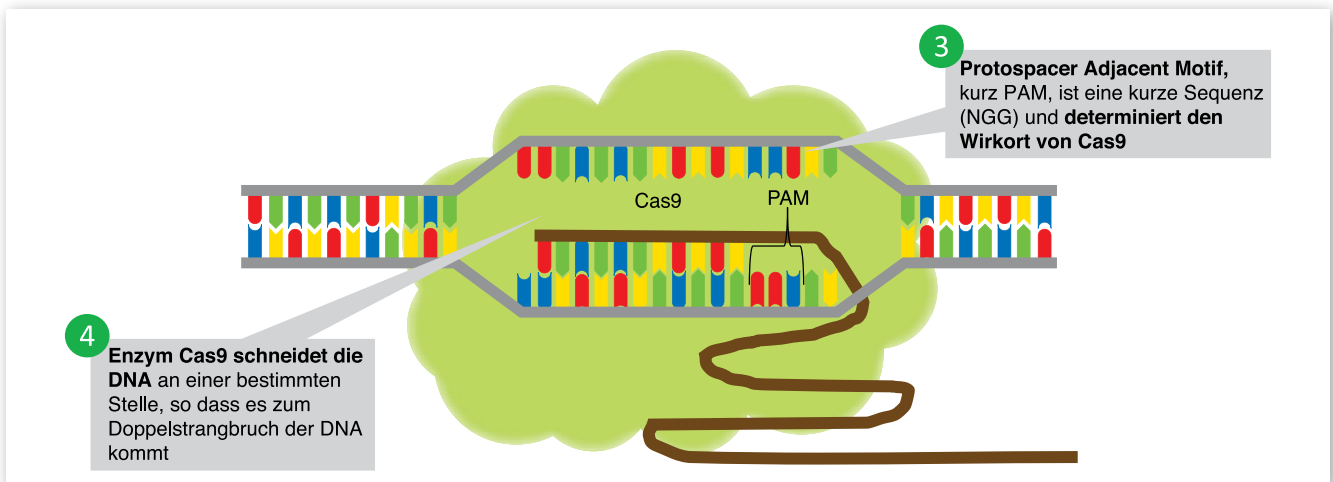


Abbildung 4b: Ist die Zielsequenz gefunden und die PAM-Sequenz vorhanden, dann ist der Wirkort von Cas9 gefunden.

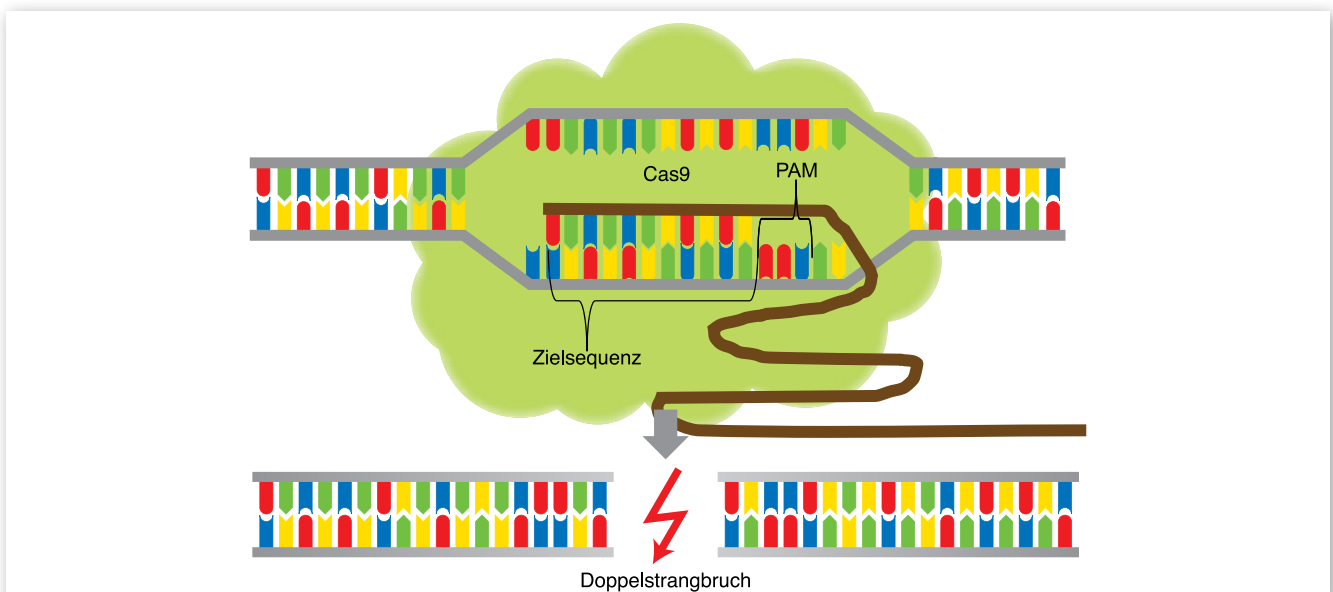


Abbildung 4c: Enzym Cas9 beginnt mit seiner Arbeit – die DNA wird geschnitten und es kommt damit zum Doppelstrangbruch.

verknüpfung bezeichnet und führt an der spezifischen Stelle des DNA-Bruches zu Mutationen (durch schwarz-weiße Nukleotide in Abbildung 5a angedeutet). Durch Mutationen (siehe oben) kann es zu Veränderungen der Genfunktion kommen. So verliert ein Gen möglicherweise seine Funktion und wird „ausgeschaltet“ (Gen-Knock-Out) oder seine Funktion wird geändert.

Alternativ besteht die Möglichkeit, die Reparatur des DNA-Stranges durch Vorlage einer konkreten Reparaturvorlage gezielt zu lenken. Diese kurze Erbgutsequenz wird dann zwischen die gebrochenen DNA-Stränge eingebaut (schematische Darstellung von drei schwarz-weißen Nukleotiden in Abbildung 5b).

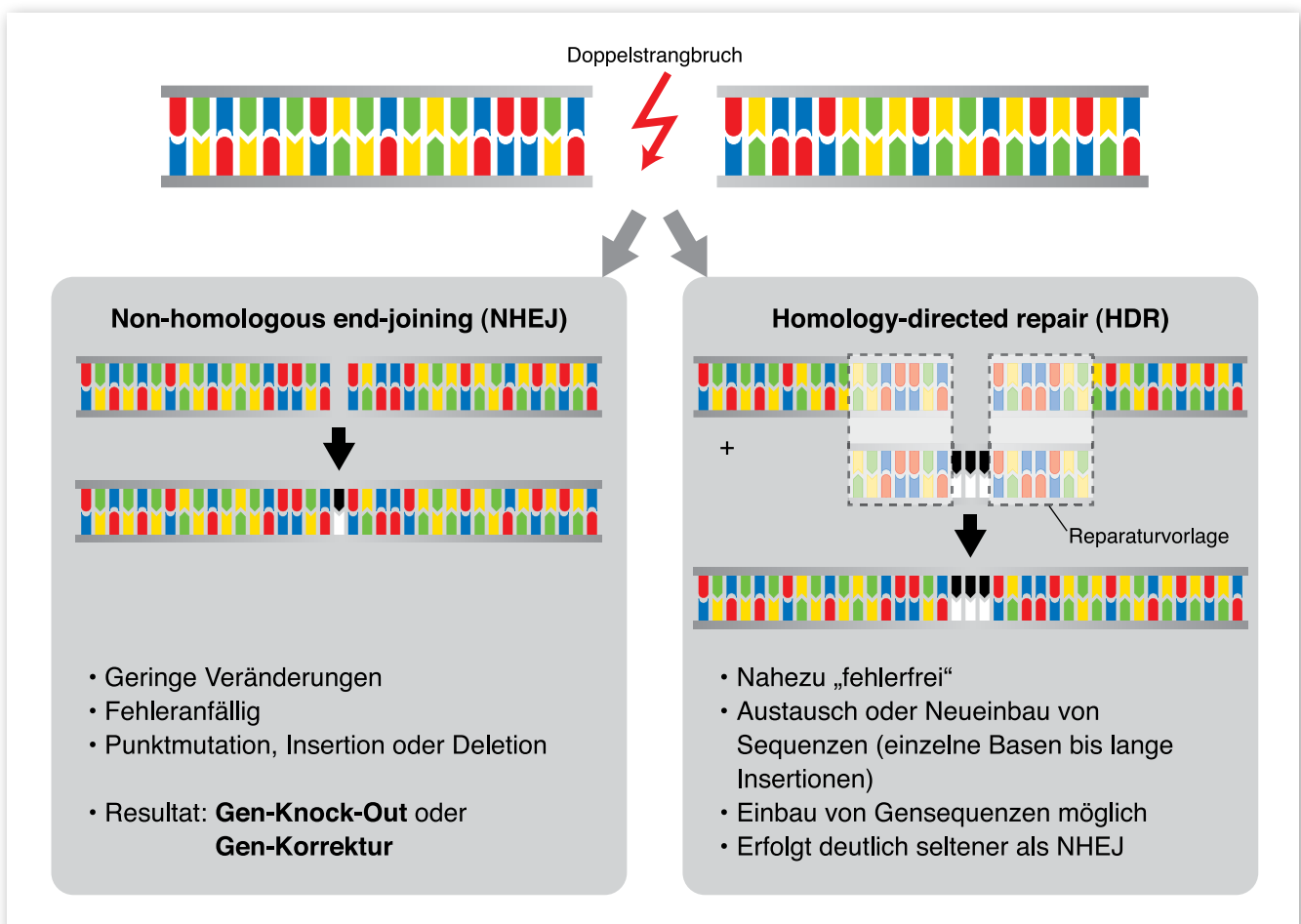


Abbildung 5: **Die Reparatur des Doppelstrangbruches stellt den abschließenden Prozess der Anwendung des Genome Editing dar.** Dabei kommen verschiedene Verfahren in Betracht: 5a (links) beschreibt eine gezielte Mutagenese mit nur geringen Modifikationen der DNA-Sequenz. Diese Art der Veränderung ist als SDN1 zu klassifizieren. 5b (rechts) beschreibt die Modifikation einer längeren Sequenz entsprechend einer vorgegebenen Reparaturvorlage. In Abhängigkeit des Grades der Veränderung ist dieser Prozess als SDN2 oder SDN3 klassifiziert (siehe Abbildung 2).

Halten wir fest: CRISPR/Cas9 als ein Verfahren des *Genome Editing* ermöglicht an einer ganz spezifischen, vorher definierten Stelle die DNA der Pflanze zu schneiden und dort die Sequenz des Erbgutes zu modifizieren.

8. Nutzen von Genome Editing in der Pflanzenzüchtung – Genome Editing im Vergleich

In Zuchtprogrammen werden Kreuzungen (meist zwischen Elitesorten) durchgeführt, um durch Rekombination und anschließende Selektion leistungsfähigere Sorten hervor zu bringen. Ist in den zur Verfügung stehenden Kreuzungspartnern jedoch eine bestimmte Merkmalskombination nicht vorhanden, bedienen sich Züchter weiterer Strategien, um entsprechende genetische Vielfalt in ihr Zuchtprogramm zu integrieren, darunter sind die Kreuzung mit Wildformen, die Kreuzung mit auf dem Markt befindlichen Sorten, die Mutagenese und die konventionelle Gentechnik zu finden.

Anhand hypothetischer Beispiele sollen die Chancen von Genome Editing im Vergleich zu den bisherigen Methoden illustriert werden. Dazu wird das Genom der Pflanze mit nur wenigen Genen (Zahlen) vereinfacht dargestellt und die simplifizierende Annahme vorausgestellt, dass Gen2 modifiziert werden soll, um eine bestimmte Merkmalsausprägung in einer Sorte zu erzeugen.

8.1 Klassische zeitaufwändige Kreuzungsschritte zur Implementierung neuer Eigenschaften aus einem Wildtyp

Oft findet sich in der Summe aller Individuen eines Zuchtprogrammes oder gar aller vorhandenen Sorten kein Donor (Spender) für ein gewünschtes Merkmal, z. B. eine bestimmte Resistenz. Dann muss man im erweiterten Genpool nach Merkmalsträgern suchen. Das kann ein Wildtyp, d. h. eine wenig angepasste Linie sein. Durch sein sonstiges Eigenschaftsprofil entspricht dieser Wildtyp jedoch überhaupt nicht den gefragten Anforderungen an Ertrag, Verarbeitungseigenschaften oder anderen Resistenz- oder Toleranzeigenschaften und eignet sich nicht für den Anbau. Üblicherweise wird daher eine Einkreuzung des „neuen“ Merkmals mit anschließenden iterativen Rückkreuzungsschritten vorgenommen. Diese Schritte sind schematisch in Abbildung 6 dargestellt.

Wie aus der Abbildung 6a hervorgeht, ist die Rückkreuzung sehr zeitaufwändig und dauert je nach Kulturart mehrere Jahre. Selbst danach ist eine direkte Nutzung in der Züchtung noch nicht gesichert und eine Leistungsdepression in anderen Merkmalen ist nicht auszuschließen. Unter der Voraussetzung, dass das CRISPR/Cas9 System etabliert ist (siehe unten Punkt Voraussetzungen) kann die Nutzung von Genome Editing zeiter sparend wirken und zudem die unerwünschten „Nebenwirkungen“ reduzieren. Durch gezielte Modifikation des Zielgenes würden besonders aufwändige Rückkreuzungsschritte entfallen.

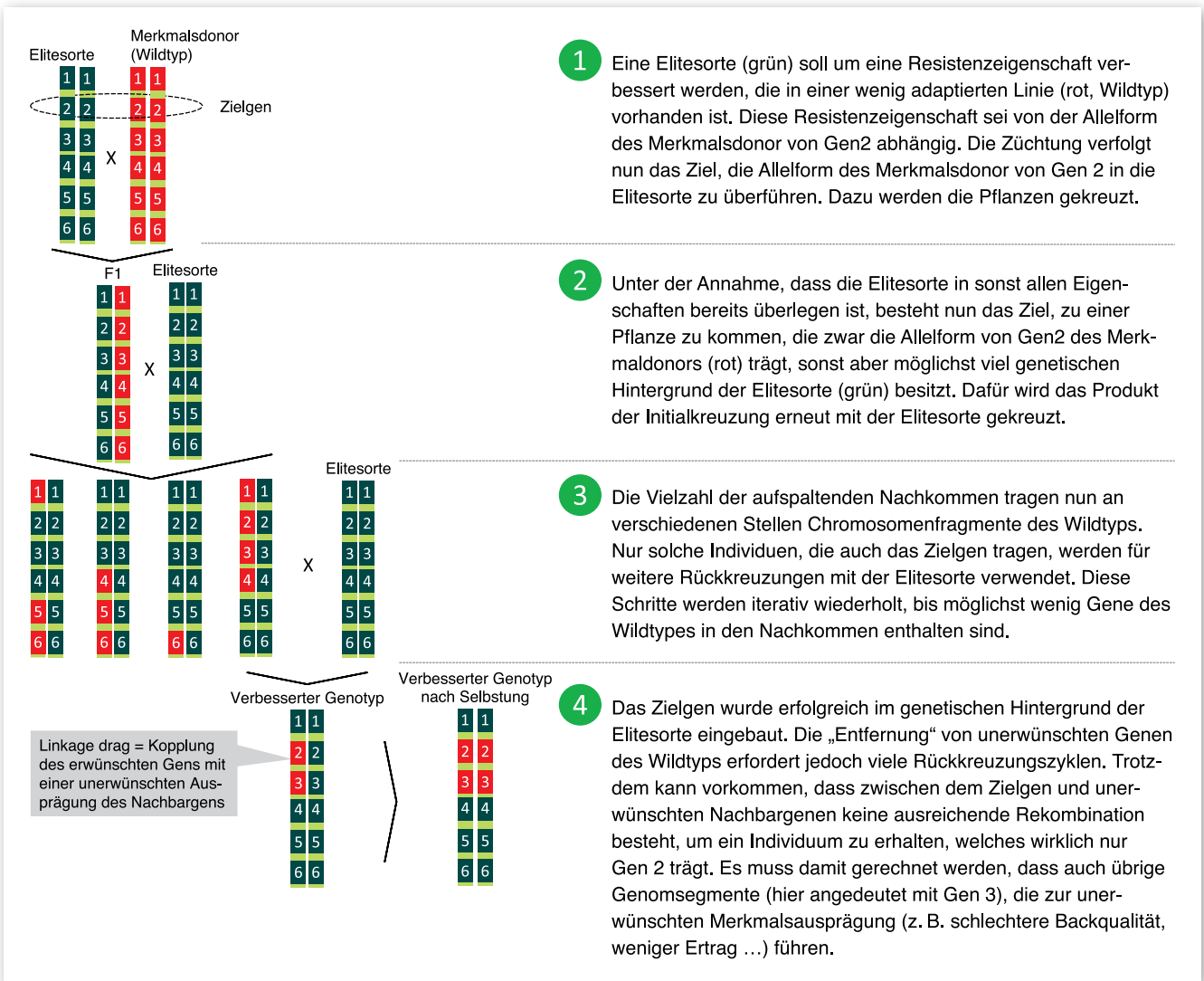


Abbildung 6a: Prinzip der Introgression eines Gens aus einer nicht adaptierten Linie (Wildtyp) in eine Elitesorte (schematisch)

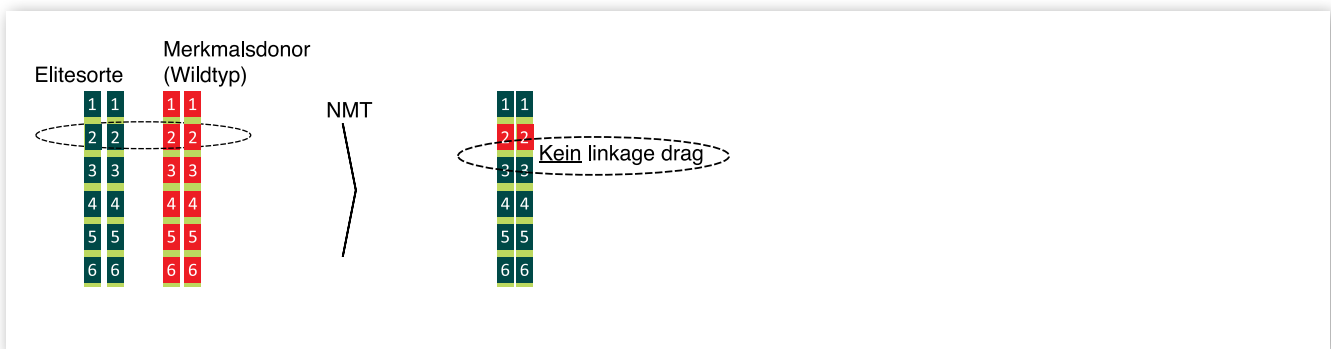


Abbildung 6b: Deutlich verkürzte Dauer der Merkmalsintrogression mit Genome Editing im Vergleich zur Rückkreuzung

8.2 Physikalische/chemische Mutagenese

In anderen Fällen, z. B. wenn auch in Wildtypen keine geeignete genetische Variation für ein Zuchtziel bekannt ist, können Mutationen auch bewusst angeregt werden. Für diese, unter dem Begriff Mutagenese bekannten Techniken, wurden bisher beispielsweise radioaktive Strahlung oder chemische Agentien genutzt. Wenn das Erbgut der Pflanzen diesen Mutagenen ausgesetzt wird, entstehen **über das gesamte Genom** verteilt zufällige Mutationen. Daher wird sie auch als ungerichtete Mutagenese bezeichnet (vgl. Abbildung 7). Je nach Mutageneseintensität sind unterschiedlich viele Gene mit Relevanz für bestimmte Funktionen betroffen. Nur mit einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit ist das Zielgen betroffen und mit noch geringerer Wahrscheinlichkeit wird das Zielgen so modifiziert, dass die erwünschte Merkmalsausprägung entsteht. Die Herausforderung besteht – neben einer optimalen Dosierung der Mutagenen – in der anschließenden Selektion gewünschter Mutanten. Da die ungerichtete Mutagenese zu einer unüberschaubaren Zahl von unerwünschten Effekten in anderen Erbgutabschnitten/Genen führt – diese werden als off-target Effekte bezeichnet –, wird ein wiederholtes Rückkreuzen notwendig, um negative off-target Effekte zu entfernen oder zumindest beachtlich zu reduzieren.

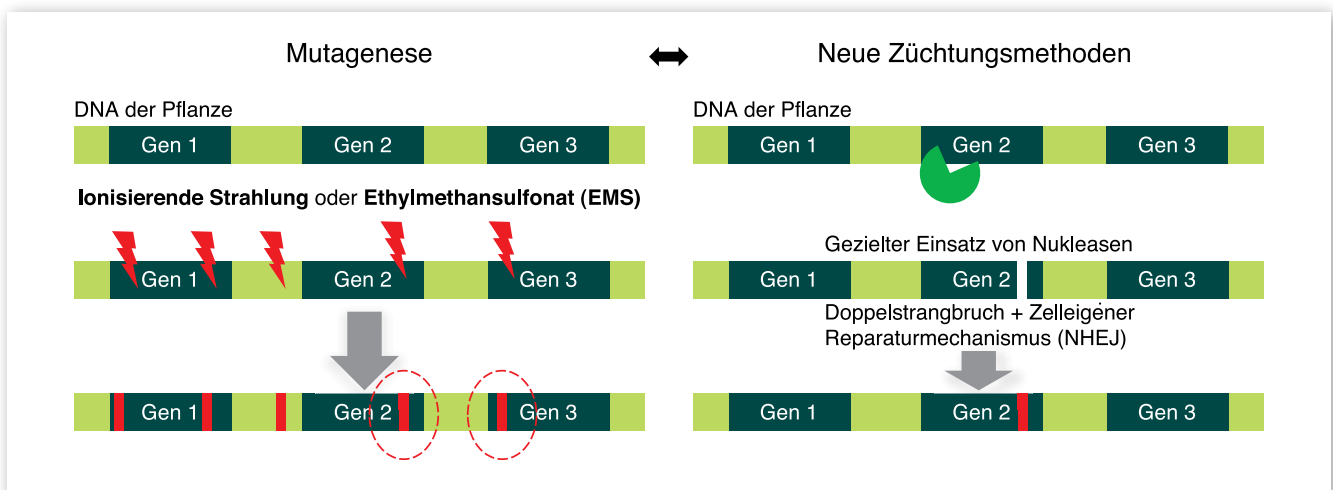


Abbildung 7: Vergleich der Mutagenese mit Genome Editing. Das hypothetische Ziel besteht darin, Gen 2 zu modifizieren (analog zum Beispiel klassische Rückkreuzung). Wird die pflanzliche DNA Mutagenen (rote Blitze) ausgesetzt, entstehen an zufälligen Stellen im Erbgut Mutationen (rote Flecken). Das Genome Editing ermöglicht es, den Ort des Einbaus zu präzisieren.

8.3 Die Gentechnik³ wie wir sie bisher kannten

Die Introgression von Erbsequenzen in einen Organismus war bereits mit der herkömmlichen Gentechnik **möglich und stellt an sich keine Neuerung dar. So konnte mit verschiedenen Techniken der herkömmlichen Gentechnik (z. B. Partikelkanone, Agrobacterium tumefaciens)** ein Fremdgen in das Erbgut eingebaut werden. Allerdings war die Stelle, an der der Einbau erfolgte, zufällig und i. d. R. nicht steuerbar. Dadurch konnte es zu unbeabsichtigten Nebenwirkungen kommen, die dadurch ent-

³ Nach dem EuGH-Urteil vom 25. Juli 2018 sind alle Pflanzen, egal ob mittels „herkömmlicher“ Gentechnik (z. B. Agrobacterium tumefaciens vermittelte Transformation) oder mit Verfahren des Genome Editing entstanden, als gentechnisch modifiziert zu bezeichnen. Hier soll zum Verständnis zwischen Genome Editing und „herkömmlicher Gentechnik“ unterschieden werden, um unabhängig von der juristischen Einschätzung die Wirkmechanismen zu differenzieren.

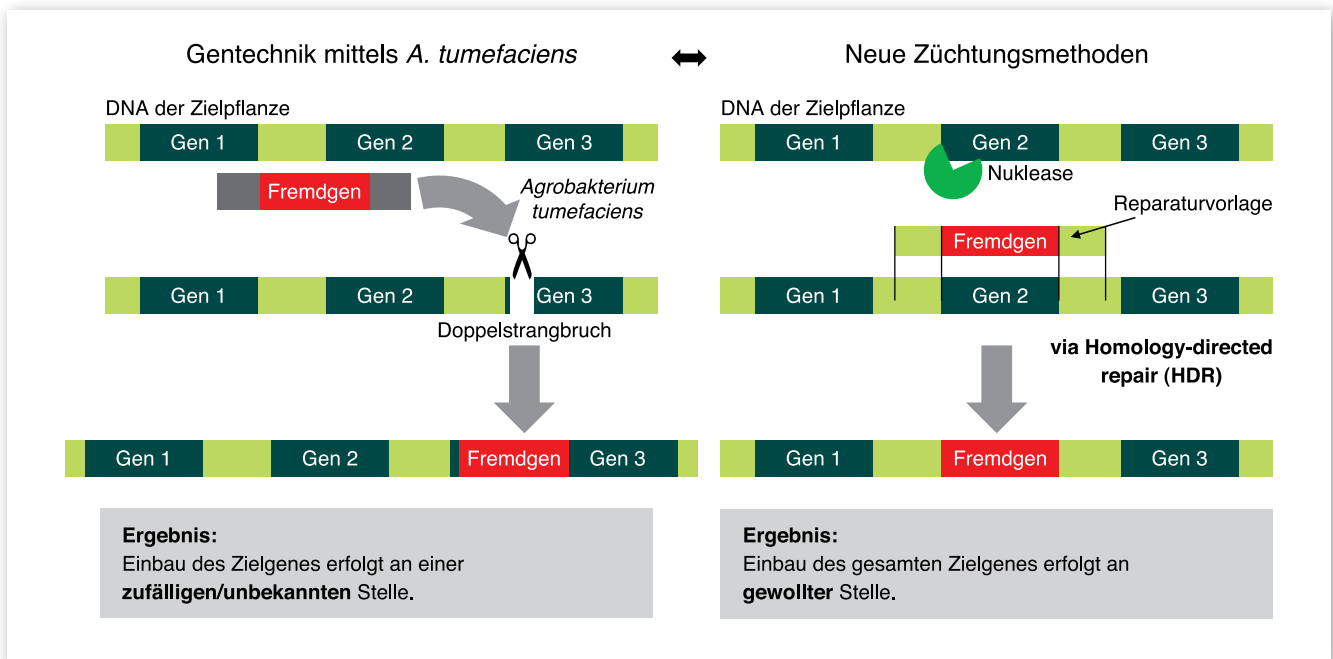


Abbildung 8: Vergleich des Genome Editing mit der „herkömmlichen Gentechnik“. Als hypothetisches Beispiel soll ein Fremdgen an Stelle des nativen Gens 2 in das Pflanzengenom eingebaut werden. Die Illustration zeigt links, dass der Agrobacterium tumefaciens vermittelte Einbau („herkömmliche Gentechnik“) unkontrolliert an einer zufälligen Stelle erfolgt (hier angedeutet in Gen 3). Das Genome Editing ermöglicht es, den Ort des Einbaus zu präzisieren und einen ungewollten Einbau und damit ggf. eine Funktionsstörung von Gen 3 zu verhindern.

standen, dass durch den Einbau des Fremdgens andere Gene in ihrer Funktion beeinträchtigt wurden. Im Unterschied dazu erlaubt Genome Editing den Einbau von Fremd-DNA an einer vorher definierten Stelle (Abbildung 8). Die Einfügung von Fremd-DNA führt dabei immer zu einem transgenen Organismus.

9. Verschiedene Varianten des CRISPR-Systems

Wie oben bereits beschrieben, erfordert ein aktives Cas9-Enzym das Vorhandensein einer PAM-Sequenz mit einer spezifischen Nukleotidsequenz unmittelbar vor der zu editierenden Stelle. Durch diese Spezifität wird das Einsatzspektrum des CRISPR/Cas9-Systems eingeschränkt. Zwar können sämtliche Gene durch Editierung ausgeschaltet werden, da es für einen Knock-out in der Regel nicht notwendig ist, ein spezifisches Nukleotid in der Gensequenz zu treffen. Anders sieht dies aus, wenn ein ganz spezifisches Nukleotid in einem Gen gezielt verändert werden soll. Ist in dem notwendigen Abstand vor dem Ziel keine PAM-Sequenz vorhanden, kann Cas9 auch nicht für die Editierung genutzt werden. Allerdings sind mittlerweile verschiedene Varianten des CRISPR-Systems bekannt, in denen andere Cas-Enzyme, wie z. B. Cas12a mit anderen Anforderungen an die PAM-Sequenz zum Einsatz kommen oder solche, die gar keine PAM-Sequenz benötigen. Vergleichsweise jung sind Modifikationen des CRISPR-Systems, durch die der Doppelstrang nicht geschnitten wird, sondern nur ein konkreter Nukleotidaustausch stattfindet (Abbildung 9). Diese Verfahren sind als Base Editing bekannt.

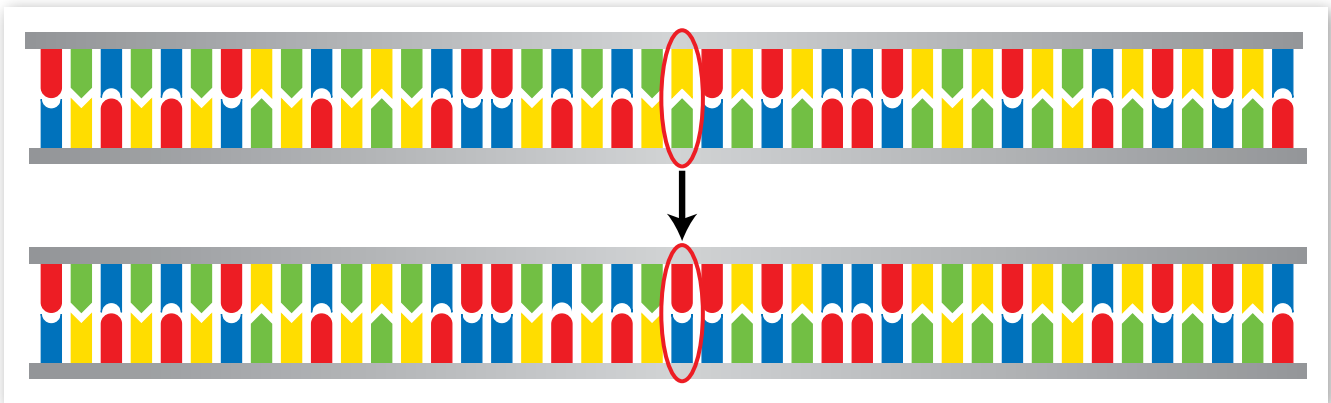


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Base Editing. Illustriert ist der punktuelle Austausch eines einzelnen Nucleotides in der sonst unveränderten DNA-Sequenz, ohne vorher einen Doppelstrangbruch zu erzeugen.

10. Welche Voraussetzungen müssen erfüllt sein, damit ein Züchter Genome Editing anwenden kann?

10.1 Kenntnis über die Zielgene

Es klingt banal, wird aber trotzdem oft vergessen: Wenn eine Pflanzeigenschaft durch Genome Editing modifiziert werden soll, muss bekannt sein, welches Gen für die Merkmalsausprägung verantwortlich ist. Häufig sind zwar durch genetische Kartierungen die ungefähren Chromosomenregionen bekannt, auf denen die genetischen Determinanten verortet sind. Allerdings befinden sich in solchen Regionen oft noch eine Vielzahl von Genen und das genaue Gen ist im Einzelnen oft nicht bekannt. Ferner muss man wissen, mit welcher Änderung eines Gens seine Funktion in die gewünschte Richtung verändert werden kann. Eine zielgerichtete erfolgreiche Merkmalsänderung durch Genome Editing setzt daher die Funktionsaufklärung voraus.

10.2 Platzierung der Komponenten

Wie kommen Cas9 und gRNA in die Pflanze? Damit CRISPR/Cas9 angewendet werden kann, müssen die *Werkzeuge* Cas9 und gRNA zunächst in der Zelle präsent sein. Hierfür gibt es verschiedene Möglichkeiten. Beim sogenannten DNA-freien Ansatz werden derzeit Anwendungen optimiert, bei denen die CRISPR/Cas-Komponenten als sogenannte Ribonukleoprotein-Komplexe in die Zelle eingebracht werden. Diese Komplexe werden nach der Editierung vollständig abgebaut und verbleiben nicht dauerhaft in der Zelle. In der Forschung werden die Gene, die für Cas9 und die gRNA codieren, bisher noch häufig mit Methoden der klassischen Gentechnik (*Agrobacterium tumefaciens*) in die Zelle eingeführt. In der folgenden Generation spalten die Nachkommen dieser Pflanze entsprechend der mendelschen Regeln auf. Nachdem das eigentliche Genome Editing stattgefunden hat, werden die Pflanzen, die die gewünschte Mutation tragen, weiter verwendet. Diejenigen Pflanzen, die die Transgene für Cas9 und gRNA tragen, werden ausselektiert. Letzteres ist beim DNA-freien Ansatz (s.o.) nicht notwendig, da zu keinem Zeitpunkt Fremd-DNA eingebaut wird. Es werden im Zuchtprogramm nur jene Pflanzen weitergeführt, die zwar die gewünschte Editierung, aber nicht die durch *A. tumefaciens* eingeschleusten DNA-Sequenzen für das Cas9 und die gRNA aufweisen. Die im Zuchtprogramm verwendeten Linien sind damit frei von Transgenen.

10.3 Lizenzrechte

Züchtungstechniken wie das Genome Editing, aber auch mit ihrer Hilfe entwickeltes und in Verkehr gebrachtes pflanzengenetisches Material sowie daraus entstehende Pflanzeigenschaften können dem Patentschutz unterliegen. Dieser Schutz für technische Erfindungen ist restriktiver als der Sortenschutz, im Rahmen dessen Pflanzenzüchter Sorten ihrer Mitwettbewerber zur Weiterzüchtung ohne deren Zustimmung nutzen können.

Es wird in der Zukunft darum gehen, Schutzrechtssysteme und Lizenzstrukturen so auszugestalten, dass alle Pflanzenzüchtungsunternehmen neue Verfahren wie z. B. CRISPR/Cas sowie daraus resultierendes Pflanzenmaterial nutzen können.

Grundsätzlich ist es für die Pflanzenzüchtung unerlässlich, einen breiten Zugang zu genetischer Vielfalt zu haben.

11. Nachweisbarkeit

11.1 Identifizierbarkeit des Mutationsursprungs

Eine vieldiskutierte Frage betrifft die Nachweisbarkeit der genetischen Modifikation. Dem Fortschritt der Genomsequenzierung ist es zu verdanken, dass es heutzutage möglich ist, das vollständige Erbgut von Pflanzen zu sequenzieren. In Kombination mit bioinformatischen Verfahren können dabei Abweichungen der DNA-Sequenz zwischen verschiedenen Individuen detektiert werden. In der Realität haben allerdings keine zwei Individuen vollkommen identische DNA-Sequenzen ihrer Genome. Somit ist es zwar technisch möglich, festzustellen, DASS die Genome zweier Individuen Abweichungen (Mutationen) voneinander aufweisen. Die entscheidende Frage ist jedoch, WIE die Mutation entstanden ist. Der Nachweis des Mutationsursprungs, also ob eine Mutation durch eine der neuen Züchtungstechniken oder durch spontane, natürliche Mutationen entstand (Mutationen, Austausch von Allelen⁴), ist nach heutigem Stand der Wissenschaft nicht möglich. Daher stellt sich die Frage, wie eine Technik reguliert und kontrolliert werden kann, wenn ihre Anwendung nicht nachgewiesen werden kann.

11.2 Off-target-Effekte

Eine andere häufig vorgetragene Besorgnis im Umgang mit Modifikationen des Erbgutes besteht in der Möglichkeit, dass nicht nur die Zielsequenz modifiziert wird, sondern auch unbemerkter Weise an anderen Stellen des Erbgutes Veränderungen hervorgerufen werden. Solche unbeabsichtigten Modifikationen werden als Off-Targets (also jenseits des Zieles) bezeichnet. Durch die Wahl hoch spezifischer DNA-Abschnitte als Ziel der Genome Editing Anwendung kann nahezu ausgeschlossen werden, dass Off-Target Mutationen entstehen können. Darüber hinaus können potenzielle Off-Target Orte aufgrund ihrer Ähnlichkeit zur eigentlichen Zielsequenz identifiziert und gezielt kontrolliert werden. Allerdings gilt auch hier, dass nach heutigem Stand des Wissens der Ursprung einer Punktmutation nicht sicher festgestellt werden kann (siehe Identifizierbarkeit des Mutationsursprunges). Insofern bleibt auch bei Feststellung einer Mutation an einem potenziellen Off-Target Ort offen, ob es sich um eine zufällige, natürliche Mutation handelt oder um eine Mutation aufgrund der Anwendung eines Genome Editing

⁴ Ein Allel ist eine von mehreren Ausprägungsformen eines Gens innerhalb einer Art; d. h. die Allele des entsprechenden Gens unterscheiden sich zwischen zwei Individuen in der DNA-Sequenz.

Verfahrens. Im Vergleich zu bisherigen Verfahren zur Erzeugung von Mutationen (s. physikalische/chemische Mutagenese) ist die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Off-Target Mutationen bei den neuen Züchtungsmethoden um mehrere Größenordnungen (bis zu mehrere tausendfach) geringer.

12. Gegenwärtige Entwicklungen zur Regulierung

Die Frage der Regulierung und Kontrolle stellte im April 2021 auch die EU-Kommission in ihrer Studie, die auf Befragungen von Mitgliedstaaten und Stakeholdern sowie Stellungnahmen wissenschaftlicher Gremien beruht. Sie kommt zu dem Ergebnis, dass die über 20 Jahre alte Gentechnikgesetzgebung und aktuelle wissenschaftliche Entwicklungen in Einklang gebracht werden sollten. Dazu hat sie einen breiten Dialog mit Gesellschaft und Politik angestoßen.

DLG-Merkblätter. Wissen für die Praxis.

- DLG-Merkblatt 432
**Resistenzmanagement im Ackerbau
– Herbizidresistenz**
- DLG-Merkblatt 427
**Resistenzmanagement im Ackerbau
– Insektizidresistenz**
- DLG-Merkblatt 424
Ackerbau zukunftsfähig gestalten
- DLG-Merkblatt 413
**Pflanzenschutz,
ohne Wasser zu gefährden**
- DLG-Merkblatt 409
**Ordnungsgemäßer Pflanzenschutz:
erst checken, dann los!**
- DLG-Merkblatt 397
**Gärreste im Ackerbau effizient
nutzen**
- DLG-Merkblatt 391
**Glyphosat – Verantwortungsvoller
Umgang mit einem Wirkstoff**
- DLG-Merkblatt 373
**Schwefel-Düngung effizient
gestalten**
- DLG-Merkblatt 352
**Lagerung von Pflanzenschutz-
mitteln auf dem landwirtschaftlichen
Betrieb**
- DLG-Merkblatt 350
N-Düngung effizient gestalten
- DLG-Merkblatt 349
Grunddüngung effizient gestalten
- DLG-Merkblatt 348
**Dokumentation in der
Pflanzenproduktion**
- DLG-Merkblatt 353
Hinweise zur Kalkdüngung



Download unter www.DLG.org/Merkblaetter



DLG e.V.
Mitgliederservice
Eschborner Landstraße 122 • 60489 Frankfurt am Main
Deutschland
Tel. +49 69 24788-205 • Fax +49 69 24788-124
Info@DLG.org • www.DLG.org