

Grundlagen zur Bewertung neuer Techniken in der Pflanzenzüchtung: RNA-abhängige Techniken, Accelerated Breeding und CRISPR-Cas

Kurzdarstellung





Universität für Bodenkultur Wien

Impressum

Eigentümer, Herausgeber und Verleger

Bundesministerium für Gesundheit und Frauen (BMGF)
Radetzkystraße 2, 1030 Wien
www.bmgf.gv.at

Autorinnen und Autoren

Dr.ⁱⁿ Julia Hilscher
Univ. Prof. Dr. Hermann Bürstmayr
Department für Nutzpflanzenwissenschaften und Department für Agrarbiotechnologie, BOKU Wien
Univ. Prof.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ Eva Stöger
Department für Angewandte Genetik und Zellbiologie, BOKU Wien

Diese Kurzdarstellung sowie der gesamte Bericht stehen zum Download auf der Website des BMGF unter www.bmgf.gv.at im Bereich Gentechnik zur Verfügung.

Erscheinungsdatum

März 2017

Inhaltsangabe

1	Einleitung.....	1
2	CRISPR-Cas.....	2
2.1	Einleitung.....	2
2.1.1	Genom-Editieren: Arten (SDN1, 2, 3).....	2
2.2	Anwendung in der Pflanzenzüchtung.....	3
2.2.1	Off-Target Effekte.....	4
2.3	Beabsichtigte und unbeabsichtigte Auswirkungen des Genom-Editierens mittels CRISPR-Cas9.....	5
2.4	Aspekte der Sicherheit von CRISPR-Cas9-basiertem Genom-Editieren.....	5
2.4.1	SDN1 Technik.....	5
2.4.1.1	Vergleich von CRISPR-Cas9-basiertem (SDN1) Genom-Editieren mit konventioneller Mutagenese hinsichtlich der Anzahl und der Art der erzeugten Mutationen.....	5
2.4.1.2	Aspekte der Sicherheit in Bezug auf Verbleiben des Transgens in resultierenden Pflanzen, Mutationen verursacht durch den Transformationsprozess und den Gebrauch von viralen Vektorsystemen.....	6
2.4.2	SDN2 Technik.....	6
2.4.3	SDN3 Technik.....	6
2.5	Detektion und Identifikation.....	6
2.5.1	Detektion und Identifikation von SDN1- und SDN2-basiertem Genom-Editieren.....	7
2.5.2	Detektion and Identifikation von SDN3-basiertem Genom-Editieren.....	7
2.6	Aspekte in Bezug zur GVO Definiton.....	7
2.7	Tabelle.....	9
3	Beschleunigte Züchtung.....	10
3.1	Einleitung.....	10
3.2	Anwendung in der Pflanzenzüchtung.....	10
3.3	Beabsichtigte und unbeabsichtigte Auswirkungen.....	11
3.4	Aspekte der Sicherheit.....	11
3.5	Detektion and identifikation.....	12
3.6	Aspekte in Bezug zur GVO Definition.....	12

4	RNAi-basierte Methoden.....	13
4.1	Einleitung.....	13
4.1.1	miRNAs - siRNAs	13
4.2	Anwendung in der Pflanzenzüchtung.....	14
4.3	Beabsichtigte und unbeabsichtigte Auswirkungen	14
4.4	Aspekte der Sicherheit	15
4.5	Detektion and Identifikation	15
4.6	Aspekte in Bezug zur GVO Definition	15
4.7	Tabelle	16
5	Abkürzungen.....	18
6	Referenzen.....	19

1 Einleitung

Fortschritte in der Forschung und Entwicklung brachten vermehrt Stakeholder Anfragen an zuständige Behörden in den EU Mitgliedsstaaten, ob Pflanzen, die aus bestimmten Züchtungstechniken resultieren, unter die legale GVO Definition fallen. Zu diesen sogenannten “Neuen Pflanzenzüchtungstechniken” (NPBT) werden derzeit gezählt: (1) Nuklease-gestütztes Genom-Editieren (SDN), (2) Oligonukleotid vermittelte Mutagenese (ODM), (3) Cisgenese und Intragenese, (4) RNA-abhängige DNA Methylierung (RdDM), (5) Propfen (auf eine GV Unterlage), (6) Reverse Züchtung, (7) Beschleunigte Züchtung, (8) Agroinfiltration, und (9) Synthetische Genomik (in Erweiterung von [1]).

Einige der genannten NPBT wurden in Studien der AGES (Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit) behandelt [2, 3]; CRISPR-Cas basiertes Genom-Editieren und die beschleunigte Züchtung sind relative neue Entwicklungen, die nun in dieser Studie beschrieben werden. Neuere Entwicklungen im Bereich der RNA-abhängigen Methoden werden ebenfalls behandelt, vor allem auch wegen ihres Potentials in der Herstellung von Pflanzen mit Resistenzeigenschaften gegen Pflanzenpathogene.

Die vorliegende Studie ist als Informationsdokument für Stakeholder im weiten Sinn gedacht und skizziert die Grundlagen und den Stand der Technik, sowie das Potential der Anwendungsgebiete. Sie beschreibt die beabsichtigten und unbeabsichtigten Effekte bei deren Anwendung auf das pflanzliche Genom und versucht dabei, andere Pflanzenzüchtungstechniken und biotechnologische Methoden in Relation zu setzen.

Die Studie zeigt, dass die behandelten Techniken großes Potential für die Anwendung in der Pflanzenzüchtung und Sortenentwicklung haben und international bereits kommerziell umgesetzt werden.

Die rechtliche Einordnung der NPBTs in der EU hat großen Einfluss auf deren weitere Verwendung in Pflanzenzüchtung in Europa und soll daher möglichst rasch und in Zusammenarbeit auf europäischer Ebene geschehen, sodass auch für die Pflanzenzüchter in Europa die rechtliche Sicherheit bei der Entwicklung von Sorten unter Verwendung dieser Methoden gewährleistet ist.

Die Information der Öffentlichkeit durch die zuständigen Behörden über Pflanzenzüchtung und über biotechnologische Methoden, deren Entwicklung und Anwendung in der Pflanzenzüchtung soll aktiv gestaltet sein und geleitet von den vorliegenden Informationen aus Wissenschaft und Technik.

2 CRISPR-Cas

2.1 Einleitung

CRISPR-Cas (Clustered regularly interspaced short palindromic repeat – CRISPR associated) basierendes Genom-Editieren beschreibt eine jüngere Methode zum Nuklease-vermittelten Genom-Editieren, bei der das Enzym über eine RNA Komponente an ihr Zielsubstrat geführt wird. Die Anzahl an Publikationen über die Anwendung von CRISPR-Cas in Pflanzen spiegelt die rapide Entwicklung in diesem Bereich über die letzten Jahre (Abb. 2.1 in der Studie).

2.1.1 Genom-Editieren: Arten (SDN1, 2, 3)

Genom-Editieren unter Anwendung von SDN-Systemen, einschließlich der CRISPR-Cas9 Technologie, kann auf verschiedene Veränderungen im Genom abzielen. Zur Zeit vorrangig (Abb. 2.6 in der Studie): (1a) zielgerichtete unbestimmte (hinsichtlich der tatsächlichen Umsetzung am Zielort erst im Nachhinein bekannte) Mutationen, (1b) Deletionen von genomischen Sequenzen (durch Setzen zweier benachbarter DSB), (2) zielgerichtete bestimmte Mutationen (durch Einbringen einer Reparaturvorlage) und (3a, 3b) Insertion zusätzlicher DNA-Sequenzen (durch Einbringen einer Reparaturvorlage oder einer Donor-DNA). Genom-Editieren mittels SDN-Systemen wird allgemein in diese drei Kategorien (SDN1, SDN2 und SDN3) unterteilt [4].

SDN1 Technik: sgRNA-Cas9 Aktivität wird in Zellen eingebracht und verursacht einen gezielten DSB. Der DSB wird durch den NHEJ-Signalweg repariert, es kann zu zielgerichteten, aber a priori unbekanntem Mutationen am Zielort kommen. In Erweiterung zur ursprünglichen Definition können auch zwei gezielte DSB gleichzeitig gesetzt werden, es kann zur Deletion der dazwischenliegenden genomischen DNA kommen. Reparaturvorlagen oder eine Donor-DNA werden bei dieser Technik per Definition nicht benutzt.

SDN2 Technik: sgRNA-Cas9 Aktivität wird zusammen mit einer Reparaturvorlage in Zellen eingebracht. Die sgRNA-Cas9 Aktivität verursacht einen gezielten DSB. Im Zuge des HDR-Reparaturmechanismus wird die Reparaturvorlage verwendet, die auf ihr kodierten, zielgerichteten Mutationen können im Genom implementiert werden.

SDN3 Technik: sgRNA-Cas9 Aktivität wird zusammen mit einer Reparaturvorlage in Zellen eingebracht. Die Reparaturvorlage enthält eine zusätzliche DNA-Sequenz (cis-, intra-, oder transgene Sequenzen). Die sgRNA-Cas9 Aktivität verursacht einen gezielten DSB. Im Zuge des HDR-Reparaturmechanismus wird die

Reparaturvorlage verwendet, die zusätzliche DNA-Sequenz kann am gewünschten Zielort inseriert werden. In Erweiterung zur ursprünglichen Definition, können zusätzliche DNA-Sequenzen auch über NHEJ an einem gewünschten Zielort eingebracht werden.

2.2 Anwendung in der Pflanzenzüchtung

Tabelle 2.1 zeigt Anwendungsbeispiele von CRISPR-Cas9-basiertem Genom-Editieren.

Wie in der Studie ausgeführt, liegen die Anwendungsmöglichkeiten der SDN1 Technik vor allem in folgenden Bereichen: (i) Eliminierung unerwünschter Inhaltsstoffe (zum Beispiel Substanzen, die die Nährstoffaufnahme negativ beeinflussen, allergenes Potential haben oder Toxizität aufweisen), (ii) Steigerung erwünschter Inhaltsstoffe (zum Beispiel Ölsäure für die Gewinnung von Öl mit höherer thermischer Stabilität), und (iii) Entwicklung von Krankheitsresistenz (zum Beispiel an rezessiven Resistenzgenen[5]).

Mit der SDN2 Technik ist es möglich, bekannte funktionelle genetische Variation zwischen Kultivaren oder aus verwandten Arten (Wildformen) in Kulturarten zu transferieren (Allel-Transfer), oder aber auch funktionelle genetische Variation, die durch Mutagenese *in vivo* oder *in vitro* (zum Beispiel gerichtete Evolution von Enzymen) erzeugt wurde in ein Genom mit ähnlichen Sequenzen einzubringen.

Genom-Editieren (SDN1, SDN2) macht eine zielgerichtete Veränderung von Genomsequenzen möglich und ergänzt somit andere Methoden in der Pflanzenzüchtung, die die Erzeugung von genetischer Variation zum Ziel haben, wie die Mutationszüchtung oder die Transgen-Technologie. Traditionelle Mutationszüchtung bietet die Möglichkeit künstlich induzierte neue genetische Variation zu erzeugen, zu beschreiben und zu nutzen. Das Potential des Genom-Editierens in der Pflanzenzüchtung liegt in der Umsetzung von bekanntem Wissen aus der Grundlagen- und der angewandten Forschung: genetische Variation, die zu Merkmalsausprägungen führt, die für die Züchtung von Interesse ist, wird genutzt. Der Fortschritt im Wissen um funktionelle genetische Variation profitiert von den neuen Sequenzierungstechnologien: Projekte, die die genetische Variation innerhalb einer Art oder verwandter Arten dokumentieren (150 Tomato Genome ReSequencing Project [6], 3000 Rice Genomes Project [7], 44 Sorghum-line Genomes [8], 302 Soybean accessions [9], 115 Cucumber lines [10]), können mit Daten aus phänotypischen Screens verbunden werden [11]. Daher ist anzunehmen, dass zukünftig eine Reihe weiterer Eigenschaften (Ertrag, Qualitätsmerkmale, Krankheitsresistenzen) auch mit der SDN1 und SDN2 Technik in Kulturpflanzen umgesetzt werden können.

Die SDN3 Technik schließlich kann cis-, intra-, und transgene Linien erzeugen, bei denen der Insertionsort vorher bestimmt wird. Dadurch können Orte im Genom für die Insertion verwendet werden, die aufgrund ihrer Eignung für die Expression eines zusätzlichen Gens ausgewählt werden können (Positionseffekte). Weiters können Expressionskassetten (auch im Nachhinein) nahe beieinander oder bei einem gewünschten endogenen Gen insertiert werden, was den Vorteil bietet, dass diese Kassetten oder die Kasette/endogenes Gen Kombination gekoppelt vererbt werden und in weiterer Folge leichter in andere Linien einkreuzbar sind.

Abgesehen vom Einsatz zum Genom-Editieren, sind CRISPR-Cas9 Module auch für die Entwicklung als Resistenzloci gegen Viren vorgeschlagen worden. Proof-of-principle Studien haben in *Arabidopsis* und *N. tabacum* gezeigt, dass sgRNA-Cas9 Expressionskassetten, die gegen Sequenzen von Geminiviren gerichtet sind, Symptome des Virenbefalls abschwächen oder unterdrücken können [12-14].

CRISPR-Cas9 Technologie wurde bereits in vielen wichtigen Nutzpflanzen angewendet, zum Beispiel in der Sojabohne (*Glycine max*) [15], in Weizen (*Triticum aestivum*) [16], Mais (*Zea mays*) [17], Gerste (*Hordeum vulgare*) [18], in der Kartoffel [19] und Tomate [20] (*Solanum tuberosum* and *S. lycopersicum*), auch in verholzenden Pflanzen wie *Populus* [21] oder *Citrus* [22].

2.2.1 Off-Target Effekte

Off-Target Aktivität wurde auch in pflanzlichen Systemen analysiert (Tabelle 7.1 der Studie). Basierend auf den heute zugänglichen Daten, ist die Spezifität von CRISPR-Cas9 in Pflanzen von denselben Faktoren (in Hinblick auf Spacer/Protospacer und PAM Sequenz) abhängig wie in anderen eukaryotischen Systemen.

Eine niedrige Off-Target Aktivität ist auch in der Pflanzenzüchtung bevorzugt, jedoch sind Off-Target Effekte im Gegensatz zur therapeutischen Anwendung tolerierbar, da sie, im Falle von negativen Effekten auf die Performance und Zuchtziele einer Sorte, im Laufe des Züchtungsprogrammes durch Rückkreuzungen eliminiert werden können, ebenso wie in der konventionellen Mutationszüchtung.

Es gibt bereits mehrere Ansätze, die Off-Target Aktivität zu reduzieren, etwa durch geschickte Auswahl der Target-Sequenz [23, 24], Verwendung von sogenannten „paired nickases“ oder die Anwendung von RNA-guided FokI-Nukleasen [25].

2.3 Beabsichtigte und unbeabsichtigte Auswirkungen des Genom-Editierens mittels CRISPR-Cas9

Die beabsichtigte Auswirkung des Genom-Editierens mittels der CRISPR-Cas9 Technologie ist die Veränderung eines vorher bestimmten genomischen Locus. Mögliche unbeabsichtigte Auswirkungen sind (i) Off-Target Effekte, (ii) das Verbleiben einer sgRNA-Cas9 Expressionskassette in resultierenden Pflanzen, (iii) Auftreten von Mutationen durch den Transformations- und/oder Regenerationsprozess (Zellkultur), die an resultierende Pflanzen weitergegeben werden, und (iv) bei der Verwendung von viralen Vektorsystemen, virale Kontamination von resultierenden Pflanzen.

2.4 Aspekte der Sicherheit von CRISPR-Cas9-basiertem Genom-Editieren

2.4.1 SDN1 Technik

Unter der Voraussetzung, dass eine stabile Integration der CRISPR-Cas9 Expressionskassette entweder nicht stattgefunden hat, oder der integrierte Locus ausgekreuzt wurde und in den resultierenden Pflanzen nicht vorhanden ist, können beabsichtigte und unbeabsichtigte Auswirkungen der SDN1 Technik mit denen der konventionellen Mutagenese verglichen werden.

2.4.1.1 Vergleich von CRISPR-Cas9-basiertem (SDN1) Genom-Editieren mit konventioneller Mutagenese hinsichtlich der Anzahl und der Art der erzeugten Mutationen

Im Vergleich zur konventionellen ungerichteten Mutagenese (z.B. radioaktive Strahlung oder Röntgenstrahlung, und chemische Mutagenese) erzeugt CRISPR-Cas9 basiertes (SDN1) Genom-Editieren Mutationen an vorher festgelegten Orten im Genom, sowie abhängig von der sgRNA, möglicherweise an einer kleineren Anzahl an Off-Target Loci. Diese können aufgrund von Sequenzvergleichen herausgefiltert und auf Mutationsaktivität getestet werden. Dieser Unterschied zwischen ungerichteter Mutagenese und Genom-Editieren zeigt auch die unterschiedlichen Anwendungsmöglichkeiten auf. Aufgrund der heutigen Datenlage ist anzunehmen, dass die Anzahl an unbeabsichtigten Mutationen erzeugt durch CRISPR-Cas9 Aktivität um ein vielfaches kleiner ist, als jene der ungerichteten physikalischen und chemischen Mutagenese. Weiters ist kein qualitativer Unterschied in der Art der beabsichtigten und unbeabsichtigten Mutationen zwischen beiden Methoden festzustellen.

2.4.1.2 Aspekte der Sicherheit in Bezug auf Verbleiben des Transgens in resultierenden Pflanzen, Mutationen verursacht durch den Transformationsprozess und den Gebrauch von viralen Vektorsystemen

Aspekte der Sicherheit für die obengenannten Bereiche werden im Kapitel 3.4 im Rahmen der beschleunigten Züchtung behandelt.

2.4.2 SDN2 Technik

Die SDN2 Technik erzeugt zielgerichtete bestimmte Mutationen. Dazu wird zusätzlich zur sgRNA-Cas9 Aktivität eine Reparaturvorlage in die Zellen eingebracht. Diese ist identisch zur Zielsequenz mit Ausnahme der vorher festgelegten Mutationen.

Für die SDN2 Technik können dieselben Aspekte wie bei der SDN1 Technik in Betracht gezogen werden. Weiters kann im Zuge des Genom-Editierens mittels der SDN2 Technik das Reparaturtemplate als ein ektopischer, cisgener Lokus an der Stelle des induzierten DSB, oder auch an anderen Stellen im Genom inseriert werden. Eine Analyse des Genoms auf solche ektopischen, cisgenen Sequenzen kann unter anderem mittels Standardmethoden (Southern-Blot, PCR-basierte Methoden) nachgewiesen werden und Linien ohne diese Events daher selektiert werden.

2.4.3 SDN3 Technik

Im Gegensatz zu konventionell hergestellten cis-, intra-, und transgenen Pflanzen erlaubt die SDN3 Technik die Insertion dieser ektopischen Sequenzen an einem vorher bestimmten Ort. Sicherheitsaspekte in Bezug auf der Schaffung neuer kodierender Abschnitte und die Zerstörung endogener Gene können daher schon im Planungsstadium berücksichtigt werden.

Sicherheitsaspekte von cis- und intragenen Pflanzen im Vergleich zu transgenen Pflanzen wurden in einer Studie der AGES [2] und in einer Scientific Opinion der EFSA [26] behandelt.

2.5 Detektion und Identifikation

In Fällen, in denen eine CRISPR-Cas9 Expressionkassette in resultierenden Pflanzen verbleibt, ist die Detektion und die Identifikation wie bei anderen transgenen Pflanzen möglich. Die Expressionkassette in Verbindung mit dem Insertionsort im Genom dient als Basis für die Entwicklung von Tests für die Detektion und Identifikation. Es ist jedoch anzunehmen, dass vorrangig genom-editierte Linien ohne stabil integrierte CRISPR-Cas9 Expressionkassetten hergestellt werden.

2.5.1 Detektion und Identifikation von SDN1- und SDN2-basiertem Genom-Editieren

Die erzeugten SDN1 und SDN2 Mutationen geben keinen Anhaltspunkt über ihre Entstehung

Veränderungen an der Sequenz der DNA sind bis zu Veränderungen an einzelnen Nukleotiden mittels Standardmethoden (PCR-basierte, Hybridisierungs-basierte Methoden, Sequenzierung) nachweisbar [27]. Die induzierten Veränderungen können jedoch nicht von natürlich oder durch konventionelle Mutagenese entstandenen Mutationen unterschieden werden und daher kann durch sie kein Rückschluß auf ihre Entstehungsweise gemacht werden. Indirekte Anhaltspunkte für die Identifizierung kann die Anwesenheit einer bestimmten Mutation in Kombination mit weiteren Markern geben: eine genom-editierte Linie kann vom Hersteller in Zusammenhang mit weiteren Markern der Linie beschrieben werden. Diese zusammen können verwendet werden, um eine Probe mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit und durch eine Kombination von Tests der genom-editierten Linie zuzuordnen. Wird jedoch die genom-editierte Linie als Kreuzungspartner in Züchtungsprogrammen verwendet, wird die genom-editierte Mutation von den anderen Markern entkoppelt. Somit wird der Identifikationsnachweis erschwert bzw. ist nicht mehr möglich.

2.5.2 Detektion and Identifikation von SDN3-basiertem Genom-Editieren

Detektion and Identifikation von Pflanzen, die mittels SDN3-basiertem Genom-Editieren verändert worden sind, folgen dem Prinzip der Detektion und Identifikation konventionell hergestellter cis-, intra- und transgener Pflanzen. Die Detektion cis- und intragener Pflanzen ist im Allgemeinen gegenüber transgenen Pflanzen erschwert, da die insertierten Sequenzen Homologie zu endogenen Sequenzen aufweisen (cis- und intragene Pflanzen wurden in der Studie der AGES diskutiert [2]).

2.6 Aspekte in Bezug zur GVO Definiton

Eine Stellungnahme des ZKBS (Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit, Deutschland; institutionalisiert durch das deutsche Gentechnikgesetz) [28] von 2012 behandelt auch die ZFN Technologie. Die Überlegungen können auf andere SDN Technologien übertragen werden. In der Stellungnahme gibt das ZKBS u.a. Schlussfolgerungen und Bewertungen zur Einordnung der aus der Technologie resultierenden Organismen in Bezug auf die GVO Definition nach der Richtlinie 2001/18/EG ab.

Die SDN3 Technik erzeugt Pflanzen, die aufgrund der Anwesenheit von cis-, intra-, und transgener Sequenzen unter die GVO Definition nach Richtlinie 2001/18/EG fallen. Andererseits besteht keine rechtliche

Klarheit, ob genom-editierte Pflanzen hergestellt mittels der SDN1 bzw. der SDN2 Technik unter diese Definition fallen oder davon abweichen.

Die SDN1 und die SDN2 Techniken erzeugen Pflanzen mit zielgerichteten Mutationen, die von genetischen Veränderungen, welche durch natürliche Prozesse oder in der Mutationszüchtung entstanden sind, nicht unterscheidbar sind. Während des Herstellungsprozesses können intermediäre Pflanzen verwendet werden, die eine CRISPR-Cas9 Expressionskassette stabil als Transgen im Genom integriert haben. In Pflanzen mit generativer Vermehrung können Nachkommen selektiert werden, die die gewünschte Mutation, aber nicht das Transgen enthalten. Weiters gibt es Möglichkeiten die sgRNA-Cas9 Aktivität ohne DNA Transfer in Zellen einzubringen.

Die ZKBS ist zu dem Schluss gekommen, dass resultierende Organismen frei von rekombinanter DNA nicht unter die Definition eines GVO nach der Richtlinie 2001/18/EG fallen sollen [28].

Die Richtlinie 2001/18/EG schließt explizit Organismen aus ihrem Geltungsbereich aus, die durch bestimmte Verfahren hergestellt wurden, diese sind das Verfahren der Mutagenese und das Verfahren der Zellfusion (einschließlich Protoplastenfusion). Weiters werden Organismen ausgeschlossen, an denen zum Beispiel das Verfahren der Polyploidie-Induktion durchgeführt wurde. Das heißt, dass Pflanzen, die durch diese Verfahren hergestellt wurden, nicht angemeldet werden müssen und nicht dem Risikomanagement der Richtlinie unterliegen.

Man kann daher folgern, dass die Richtlinie 2001/18/EG auch mögliche unbeabsichtigte Effekte, die sich aus der Anwendung dieser Techniken (Mutagenese, Zellkulturpassage, Polyploidie-Induktion, Kreuzung weit verwandter Arten) ergeben können, außerhalb der Gesetzgebung durch die Richtlinie 2001/18/EG kontrollierbar sieht, also durch die Beobachtung während des Züchtungsprozesses und der Sortenentwicklung durch den Züchter. Von einem wissenschaftlichen Standpunkt aus sind Mutationen, beabsichtigte und unbeabsichtigte, in (cis-, intra- und transgenfreien) genom-editierten Pflanzen nicht qualitativ unterschiedlich zu solchen, die auf natürliche Weise entstehen können oder die durch die Anwendung der obengenannten Methoden, die nicht durch die Richtlinie 2001/18/EG kontrolliert werden, entstehen können. Im Hinblick auf die Quantität der erzeugten Mutationen entstehen durch den Prozess des Genom-Editierens eine vergleichsweise geringere Anzahl an Mutationen, als zum Beispiel durch chemische Mutagenese (bei letzterer typischerweise in der Größenordnung von hunderten – tausenden pro Individuum).

2.7 Tabelle

Tabelle 2.1 Genom-editierte Nutzpflanzen, Beispiele aus Datensätzen mit Anfragen an die US Behörde APHIS^a

Nutzpflanze	Technik	Eigenschaft	Entwickler	Behörde
Mais	CRISPR – SDN1	hoher Amylopektin-Gehalt	DuPont Pioneer	USDA/APHIS April 2016
Zucht-Champignon	CRISPR – SDN1	verminderte Braunfärbung	Pennsylvania State University	USDA/APHIS April 2016
Weizen	TALEN – SDN1	verbesserte Krankheitsresistenz gegen den echten Mehltau (<i>Blumeria graminis</i>)	Calyxt [29]	USDA/APHIS February 2016
Mais	Meganuclease – SDN1	Akkumulation von Stärke in Blatt- und Halmgewebe	Agrivida	USDA/APHIS November 2015
Reis	TALEN – SDN1	verbesserte Resistenz gegen Weißblättrigkeit (<i>Xanthomonas oryzae pv. oryzae</i>) (Feldversuche)	Iowa State University [30]	USDA/APHIS Mai 2015
Soja	TALEN – SDN1	hoher Ölsäure-Gehalt	Collectis	USDA/APHIS May 2015
Mais	Meganuclease – SDN2/3?	verbesserte Photosynthese-Effizienz	Benson Hill Biosystems	USDA/APHIS May 2015
Kartoffel	TALEN – SDN1	Gehalt an reduzierendem Zucker unter Detektionsgrenze; in Folge verringerte Acrylamid-Produktion in erhitzten Produkten ^b	Collectis [31]	USDA/APHIS November 2014
Mais	ZFN – SDN3	reduzierter Phytat-Gehalt	Dow Agro Science [32]	USDA/APHIS March 2012

^a)US Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service; eingetragen unter Regulated Letters of Enquiry (under 7 CFR part 340) (<https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/biotechnology/am-i-regulated>)

^b)keine öffentlicheAngabe in Anfrage an USDA/APHIS; Angabe aus [31]

3 Beschleunigte Züchtung

3.1 Einleitung

Beschleunigte Züchtung beschreibt eine Methode, die die Verkürzung der Dauer von Züchtungsprogrammen zum Ziel hat [33]. Sie ist vor allem in Pflanzen mit langer Generationsdauer von Interesse (z.B. Bäume). In der beschleunigten Züchtung werden Linien hergestellt, die ein dominant wirkendes Transgen tragen, das eine verkürzte Generationsdauer verleiht (vorzeitige Blüte). Diese Linien werden als Kreuzungspartner verwendet und verkürzen durch Einbringen des dominanten Transgens die Dauer zwischen aufeinanderfolgenden Kreuzungen. An dem Punkt im Züchtungsprozess, an dem Individuen in der Population vorliegen, die die gewünschten Eigenschaften kombinieren, werden aus jenen diese selektiert, die das dominante Transgen nicht beinhalten (Null-Segreganten) [33].

Beschleunigte Züchtung bietet die Möglichkeit, in Kombination mit der Anwendung der markergestützten Selektion (MAS), die Dauer und Kosten (Infrastruktur) von Züchtungsprogrammen zu verringern; die Anzahl von Züchtungsprogrammen in Arten mit langer Generationsdauer könnte dadurch ansteigen [34-36].

3.2 Anwendung in der Pflanzenzüchtung

Pflanzenzüchtung in Arten mit langer juveniler Phase ist ein zeitintensiver Prozess. Juvenilphasen von Apfel (*Malus domestica*) und Birne (*Pyrus communis*) können beispielsweise 6 – 12 Jahre unter Feldbedingungen betragen [37]. Die beschleunigte Züchtung könnte dazu beitragen, dass vermehrt Programme in Arten mit langer Juvenilphase durchgeführt werden. Dadurch könnten auch in diesen Arten wichtige Zuchtziele, wie etwa das Einkreuzen von Resistenzgenen aus verwandten Arten, in einem praktikablen Zeitrahmen verwirklicht werden.

Der Forschungsschwerpunkt liegt derzeit bei mehrjährigen holzigen Pflanzen. Die meisten wissenschaftlichen Publikationen gibt es über Apfel und Pappel, gefolgt von Citrus, einzelne Arbeiten über die Birke, Eukalyptus, Birne und Pflaume (Referenzen und eine Übersicht in der Tabelle 3.1 in der Studie). Weiters gibt es eine Arbeit, die diesen Ansatz auch in Soja beschreibt [38].

Züchtungsprogramme zur Pyramidisierung von Resistenzgenen unter Einbinden der beschleunigten Züchtung wurden in Apfel (*Malus domestica*) und in der Pflaume (*Prunus domestica*) gestartet; an beiden sind öffentliche Forschungsanstalten beteiligt.

3.3 Beabsichtigte und unbeabsichtigte Auswirkungen

Der beabsichtigte Effekt der beschleunigten Züchtung ist die Verwendung eines Kreuzungspartners mit einem Frühblüher-Phänotyp, durch den die einzelnen Züchtungszyklen in ihrer Dauer verkürzt werden.

Mögliche unbeabsichtigte Auswirkungen bei der Verwendung transgener Linien als Kreuzungspartner sind (i) das Verbleiben der transgenen Expressionskassette in resultierenden Individuen, (ii) das Auftreten von Mutationen durch den Transformations- und/oder Regenerationsprozess (Zellkultur), die an resultierende Pflanzen weitergegeben werden, und (iii) bei der Verwendung von viralen Vektorsystemen, virale Kontamination von resultierenden Pflanzen.

Mögliche unbeabsichtigte Auswirkungen verursacht durch die Kombination zweier genomischer Hintergründe durch den Zuchtprozess können auch in der konventionellen Züchtung vorkommen und sind nicht auf die Anwendung der beschleunigten Züchtung zurückzuführen.

3.4 Aspekte der Sicherheit

Verbleiben des Transgens in resultierenden Organismen

Resultierende Organismen werden aufgrund der gewünschten Neukombination an Eigenschaften ausgesucht analog zu konventionellen Züchtungsprogrammen. Zusätzlich werden als resultierende Individuen jene selektiert, die das Transgen für die Blühverfrühung nicht mehr tragen (Nullsegreganten). Transgene Linien, die im Rahmen der beschleunigten Züchtung hergestellt werden, werden auf den Ort der Insertion sowie auf die Anzahl der Insertionen untersucht, weiters wird die Anwesenheit bzw. Abwesenheit des Transgens während des Zuchtprogramms überprüft, da dies wichtige Parameter für die Auswahl der Kreuzungspartner sind (Kapitel 3.2.4 der Studie). PCR-Techniken werden verwendet, um Insertions-Orte zu lokalisieren, Southern Blotting gilt als eine Standardmethode für die Analyse der Kopienzahl eines Transgens.

Für die Überprüfung der Abwesenheit eines Transgens in resultierenden Organismen können PCR-Techniken und Southern Blotting als Analysetechniken verwendet werden, weiters ist auch die Sequenzierung des Genoms basierend auf Next-Generation-Sequencing Methoden möglich [39].

Mutationen verursacht durch den Transformationsprozess

Die durchgeführten Schritte während des Transformationsprozesses und/oder des Regenerationsprozesses können zu ungerichteten Mutationen führen. Mutationen können einen Effekt auf die Ausgestaltung der Expression des Genoms haben, können aber auch als sogenannte „leise“ Mutationen keine Auswirkung haben. Mutationen können vorteilhaft, nachteilig oder neutral sein; dies kann sich je nach

Umweltbedingung auch ändern. Unbeabsichtigte Mutationen treten auch in der konventionellen Züchtung und in der konventionellen Gewebekultur auf.

Virale Kontamination

Die Aktivität des verfrühten Blühens kann auch mittels viraler Vektoren in Pflanzen eingebracht werden. Um die Anwesenheit von Viren in resultierenden Organismen auszuschließen, gibt es verschiedene Eliminationsmethoden, weiters kann die An/Abwesenheit von Viren durch Nachweise über DNA, RNA oder Protein-Epitope getestet werden [40].

3.5 Detektion and identifikation

Intermediäre Pflanzen mit dem Phänotyp der verfrühten Blüte können transgene Pflanzen sein. In diesem Fall dient die Expressionskassette in Verbindung mit dem Insertionsort im Genom als Basis für die Entwicklung von Tests für die Detektion und Identifikation.

Resultierende Pflanzen der beschleunigten Züchtung sind frei vom Transgen (Nullsegreganten), das für das verfrühte Blühen zuständig ist. Es kann daher nicht über die Detektions- oder Identifikationsmethoden nachgewiesen werden, dass sie durch die Methode der beschleunigten Züchtung hergestellt wurden.

3.6 Aspekte in Bezug zur GVO Definition

Intermediäre Pflanzen mit einem stabil integriertem Transgen fallen unter die GVO Definition nach der Richtlinie 2001/18/EG. Es herrscht zur Zeit keine Rechtssicherheit, ob Nachkommen von diesen intermediären Pflanzen, die kein Transgen besitzen (Nullsegreganten), unter die GVO Definition fallen oder nicht.

Das ZKBS kommt in ihrer Stellungnahme in einer analogen Situation bei der Reversen Züchtung zum Schluss, dass diese resultierenden Organismen nicht unter die GVO Definition nach der Richtlinie 2001/18/EG fallen [28].

4 RNAi-basierte Methoden

4.1 Einleitung

RNAi-basierte Methoden nutzen den zelleigenen Vorgang der RNA Interferenz (RNAi) [41], um die Expression gewünschter RNAs herunterzuregulieren oder abzuschalten. Im Zentrum des RNAi Mechanismus stehen doppelsträngige RNA Moleküle (dsRNA), die im Zuge des RNAi-Pathways zu kurzen einzelsträngigen RNAs prozessiert werden und in einem Ribonukleo-Proteinkomplex (RISC, für RNA induced silencing complex) ihre Funktion ausführen. Die dsRNA kann im natürlichen Kontext aus unterschiedlichen Quellen stammen und wird in der RNAi-basierten Anwendung durch eine transgene Expressionskassette in die Zellen eingebracht.

In Fällen, in denen die Expression eines Gens über den Abbau der RNA beeinflusst wird, spricht man von Post-Transkriptionellem Gen-Silencing (PTGS). Es gibt aber auch RNAi-Signalwege, die zur Abschaltung der Genexpression führen (Transkriptionelles Gen-Silencing, TGS); dies wird über das Anbringen epigenetischer Modifikationen am Genort erreicht. TGS wurde in einer Studie der AGES behandelt [3] und wird hier nicht weiter besprochen.

RNAi-Signalwege werden auch basierend auf der Herkunft und Biogenese der dsRNAs in microRNA (miRNA) und small inhibitory RNA (siRNA) Signalwege eingeteilt [41-43].

4.1.1 miRNAs - siRNAs

miRNAs in Pflanzen wurden in der Regulation einer ganzen Reihe von entwicklungsgenetischen Prozessen und von biotischen und abiotischen Stress-Signalwegen beschrieben [44]. Sie werden von *MIR* Genen codiert [42]; viele Arten besitzen ≥ 100 *MIR* Loci [45].

Unter dem Begriff siRNAs fasst man kleine RNAs aus wiederum unterschiedlicher Herkunft zusammen. Als unterscheidendes Merkmal zu miRNAs haben sie gemeinsam, dass ihre dsRNA Vorläufer-Moleküle in mehrere Fragmente prozessiert werden. *MIR* Gene hingegen codieren für die Herstellung einer in ihrer Sequenz genau bestimmten miRNA (Abbildung 4.2 und 4.3 in der Studie). siRNA Pathways können weiters einen Signal-Amplifikationsschritt beinhalten durch Aktivität von RdRPs (RNA-dependent RNA Polymerases) [41-43]. Deren Aktivität kann auch zu Transitivity führen, das heißt, sekundäre siRNAs, die sich vom Pool der primären siRNAs unterscheiden, werden hergestellt [46].

4.2 Anwendung in der Pflanzenzüchtung

Die Tabelle 4.1 der Studie listet publizierte Beispiele von Nutzpflanzen auf, die die Anwendung RNAi-basierter transgener Pflanzen aufzeigen. Die Tabelle 4.2 beinhaltet Beispiele RNAi-basierter transgener Nutzpflanzen die für kommerzielle Zwecke entwickelt und von regulatorischen Behörden begutachtet wurden; einige der Beispiele sind oder waren in Verkehr gebracht.

RNAi-basierte Sortenentwicklung kann über die Regulation pflanzeneigener Gene erfolgen, und so zum Beispiel Qualitätsmerkmale, agronomische Eigenschaften oder abiotische und biotische Stress-Toleranz an gewünschte Ziele anpassen. Unter publizierten Nutzpflanzen mit veränderten Qualitätsmerkmalen finden sich solche mit erhöhtem Gehalt an erwünschten Inhaltsstoffen (z.B. Amylose in Weizen [47]; Sekundärmetabolite in Raps und Tomate [48, 49]); weiters Beispiele mit reduziertem Gehalt an unerwünschten Inhaltsstoffen (Phytat in Reis [50]; allergene Epitope im Apfel [51, 52] und der Karotte [53]; α - und/oder ω -Gliadine in Weizen [54-56]). Stresstoleranz gegen Trockenheit wurde in Raps, Mais und der Kartoffel über unterschiedliche Target-Gene implementiert [57-60]. Die Möglichkeit mittels RNAi-basierter Regulation Resistenzen gegen Pathogene zu entwickeln, wurde zum Beispiel in Reis (*Xanthomonas oryzae* [61]) gezeigt. RNAi-basierte transgene Nutzpflanzen, die bereits von Behörden autorisiert wurden (Tabelle 4.2), sind z.B. in der EU Sojalinien mit erhöhtem Ölsäure-Gehalt. In den USA gibt es weiters seit kurzem eine Kartoffel- und eine Apfelsorte, bei denen die Braunfärbung nach Schneiden oder Verletzungen reduziert sind. Die Kartoffelsorte ist weiters auf Anwendungen unter Erhitzung optimiert: sie produziert nur wenig Acrylamid beim Prozess des Frittierens.

Es können aber auch Target-Gene in mit der Pflanze interagierenden Pathogenen beeinflusst werden. So können RNAi-basierende transgene Pflanzen mit Virusresistenzen [62] [63, 64] entwickelt werden, aber auch Resistenz gegen Insekten [65], Nematoden [66-68], Pilze [69-71] und möglicherweise Bakterien. Letztere werden oft unter der Bezeichnung HIGS, host induced gene silencing, zusammengefasst, die Anwendung stellt eine neuere Entwicklung dar. In den USA wurde 2015 von der EPA (Environmental Protection Agency) ein erster Feldversuch zugelassen, der eine Maislinie (MON-87411-9) mit einer HIGS-basierten Resistenz gegen den Westlichen Maiswurzelbohrer testet (Tabelle 4.2).

4.3 Beabsichtigte und unbeabsichtigte Auswirkungen

Der beabsichtigte Effekt RNAi-basierter Anwendungen in der Pflanzenzüchtung ist die Reduktion (i) der Expression erwünschter Gene oder (ii) der Anwesenheit von RNA-Molekülen anderer Herkunft. Das kann pflanzeneigene RNA oder RNA von Pathogenen, die mit Pflanzen interagieren, sein (virale RNA, HIGS-basierte Anwendungen). Mögliche unbeabsichtigte Auswirkungen bei der Verwendung RNAi-basierter

Techniken sind Off-Target Effekte. Dies kann sowohl pflanzeigene Genexpression betreffen als auch Genexpression von Non-Target Organismen (NTO).

4.4 Aspekte der Sicherheit

Gegenwärtig wird die Risikobewertung von gentechnisch veränderten (GV) Pflanzen in Bezug auf mögliche Besonderheiten von RNAi-basierten GV Pflanzen diskutiert und analysiert [72], in der EU vorrangig auf Ebene der EFSA (Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit).

Die EFSA entwickelt Leitlinien für die vorgeschriebene Risikobewertung von gentechnisch veränderten Organismen (GVO). Diese Dokumente bieten eine Hilfestellung in der Erstellung von Dossiers für die Anmeldung von GVOs nach der Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 über genetisch veränderte Lebens- und Futtermittel oder nach der Richtlinie 2001/18/EG (Freisetzungsrichtlinie). Die Mehrheit, der zur Zeit weltweit und in der EU zugelassenen GV Pflanzen, basieren auf der Expression eines oder mehrerer zusätzlicher Proteine. Es ist jedoch anzunehmen, dass in Zukunft vermehrt RNAi-basierte GV Linien entwickelt werden, zum Beispiel aufgrund ihres Potentials in der Entwicklung biotischer Stress-Resistenz oder in der Entwicklung von Pflanzen mit geänderter Inhaltsstoffzusammensetzung [73].

Die EFSA organisierte dazu 2014 den Workshop "Risk assessment considerations for RNAi-based GM plants" [74, 75]. Aufbauend darauf gab es 2015 eine Ausschreibung für einen "Literature review of baseline information to support the risk assessment of RNAi-based GM plants" (OC/EFSA/GMO/2015/01; OC/EFSA/GMO/2015/02). Dieser deckt die Bereiche (i) molekulare Charakterisierung, (ii) Risikobewertung hinsichtlich der Verwendung als Lebens- und Futtermittel und (iii) Umweltrisikobewertung von RNAi-basierten GV Pflanzen ab. Zu den drei Bereichen wurden von der EFSA detaillierte, relevante Fragestellungen formuliert, zu denen in der Literaturstudie die vorhandenen Informationen zusammengestellt und analysiert werden. Ergebnisse daraus werden in der Erstellung von speziellen Leitlinien für die Risikobewertung von RNAi-basierten GV Pflanzen verwendet, sowie, falls relevant für die Risikoabschätzung, weitere Forschungsbereiche aufzeigen.

4.5 Detektion and Identifikation

RNAi-basierte transgene Pflanzen tragen eine Expressionskassette. Diese in Verbindung mit dem Insertionsort im Genom dient als Basis für die Entwicklung von Tests für die Detektion und Identifikation.

4.6 Aspekte in Bezug zur GVO Definition

RNAi-basierte transgene Pflanzen fallen unter die GVO Definition nach der Richtlinie 2001/18/EG.

4.7 Tabelle

Tabelle 4.2 Beispiele RNAi-basierter transgener Nutzpflanzen, welche von zuständigen regulatorischen Behörden begutachtet und für kommerzielle Zwecke zugelassen wurden oder für die Evaluation im Freiland zu Testzwecken⁺

Nutzpflanze	Eigenschaft	Behörde	Entwickler
	Biotische Stress-Resistenz		
Pflaume (Event C5; 'Honeysweet')	Scharka-Virus Resistenz	USA: Determination of Non-regulated status by APHIS, USA 2007** US-FDA completed review 2009* US-EPA registration 2010 §	US Department of Agriculture (USDA) Agricultural Research Service (ARS) in cooperation with Research Institutes in Europe
Gartenbohne (EMBRAPA 5.1)	Bean Golden Mosaic Virus (BGMV) Resistenz	Brazil: Regulatory approval for food, feed and cultivation 2011*,§§	Embrapa, Brazilian Agricultural Research Corporation
Mais ⁺ MON-87411-9	<i>Diabrotica virgifera virgifera</i> (Western corn rootworm (WCR)) Resistenz	USA: Determination of Non-regulated status by APHIS, USA 2015** US-FDA completed review 2014* US-EPA registration 2015 for agronomic evaluation (not authorised for commercial purposes) ⁺	Monsanto
	Qualitätseigenschaften		
Kartoffel Innate™ potatoes 1 st generation	verringerte Entwicklung der Schwarzfleckigkeit verringertes Gehalt an Asparagin und reduzierende Zucker Gehalt, dadurch verringerte Acrylamidbildung bei Erhitzung	USA: Determination of Non-regulated status by APHIS, USA, 2014** US-FDA completed review 2015*** for events in bold	J.R. Simplot Company, USA
Apfel Arctic™ Apple	verringerte Braunfärbung nach Schneiden oder Verletzung des Apfels	USA: Determination of Non-regulated status by APHIS, USA, 2015** US-FDA completed review 2015*** Canada: Health Canada: approved product for sale and growth as GM Food 2015 *, #	Okanagan Specialty Fruits Inc, Canada

Nutzpflanze	Eigenschaft	Behörde	Entwickler
Luzerne KK179	reduzierter Ligningehalt, dadurch höhere Flexibilität für den Erntezeitpunkt (hoher Ligningehalt unerwünscht)	USA: Determination of Non-regulated status by APHIS, USA, 2014** US-FDA completed review for use in animal feed 2013***	Monsanto; Forage Genetics International, USA
Soja MON 87705 (Vistive Gold™)	erhöhter Ölsäure- und verringerter Linolsäuregehalt, dadurch höhere oxidative Stabilität	EU: Authorisation for use as/in Food and Feed 2015 ### USA: Determination of Non-regulated status by APHIS, USA, 2011** US-FDA completed review 2011***	Monsanto
Soja DP 305423 (Plenish Soy)	erhöhter Ölsäure- und verringerter Linolsäuregehalt, dadurch höhere oxidative Stabilität	EU: Authorisation for use as/in Food and Feed 2015 ### USA: Determination of Non-regulated status by APHIS, USA, 2010** US-FDA completed review 2009***	DuPont Pioneer
Tomate FlavrSavr™	verringertes Zellwandabbau, dadurch verlängerte Reife, verlängerte Lagerfähigkeit,; prozessierte Tomaten besitzen höhere Viskosität	USA: Determination of Non-regulated status by APHIS, USA, 1992** US-FDA completed review 1994*	Calgene, USA

Die angeführten RNAi-Linien können auch weitere Transgene enthalten, beschrieben sind jedoch nur diese, die auf dem RNAi-Mechanismus basieren.

* Center for Environmental Risk Assessment (CERA) (<http://www.cera-gmc.org>)

** Petitions for Determination of Nonregulated Status Database, US Department of Agriculture (USDA) Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS):
https://www.aphis.usda.gov/biotechnology/petitions_table_pending.shtml

*** US-FDA Inventory on Biotechnology Consultations on Food from GE Plant Varieties: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=Biocon>

Health Canada, Novel Food Decisions: <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/gmf-agm/appro/index-eng.php>

FSANZ Food Standards Code – Standard 1.5.2 – Food produced using Gene Technology <https://www.comlaw.gov.au/Series/F2008B00628/Compilations>

EU Register of authorised GMOs http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm

§ US Environmental Protection Agency (EPA) Plant Incorporated Protectant (PIP) registrations: <http://www.epa.gov/regulation-biotechnology-under-tsca-and-fifra/overview-plant-incorporated-protectants>

§§ ISAAA, International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications, GM Approval Database: <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>

5 Abkürzungen

Cas CRISPR associated

CRISPR Clustered regularly interspaced short palindromic repeats

ds double stranded

DSB double strand break

EFSA European Food Safety Authority

GVO genetisch veränderter Organismus

HDR homology directed repair

HIGS host induced gene silencing

miRNA micro RNA

NHEJ non-homologous end joining

nt nucleotide

NTWG New Techniques Working Group

PCR polymerase chain reaction

PTGS post-transcriptional gene silencing

SDN site directed nuclease

RISC RNA induced silencing complex

RNAi RNA interference

sgRNA single guide RNA

siRNA small inhibitory RNA

ss single strand

TGS transcriptional gene silencing

ZFN zinc finger nuclease

ZKBS Zentrale Kommission für Biologische Sicherheit

6 Referenzen

- [1] Lusser M, Parisi C, Plan D, E, R.-C., *New plant breeding techniques*, Joint Research Centre — Institute for Prospective Technological Studies, Luxemburg 2011.
- [2] AGES, *Cisgenesis - A report on the practical consequences of the application of novel techniques in plant breeding*, Bundesministerium für Gesundheit, Wien 2012.
- [3] AGES, *New plant breeding techniques. RNA-dependent methylation, Reverse breeding, Grafting*, Bundesministerium für Gesundheit, Wien 2013.
- [4] Lusser, M., Parisi, C., Plan, D., Rodriguez-Cerezo, E., Deployment of new biotechnologies in plant breeding. *Nature biotechnology* 2012, 30, 231-239.
- [5] Pavan, S., Jacobsen, E., Visser, R. G. F., Bai, Y., Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance. *Molecular Breeding* 2010, 25, 1-12.
- [6] Aflitos, S., Schijlen, E., de Jong, H., de Ridder, D., *et al.*, Exploring genetic variation in the tomato (*Solanum section Lycopersicon*) clade by whole-genome sequencing. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 2014, 80, 136-148.
- [7] Li, J. Y., Wang, J., Zeigler, R. S., The 3,000 rice genomes project: new opportunities and challenges for future rice research. *GigaScience* 2014, 3, 8.
- [8] Mace, E. S., Tai, S., Gilding, E. K., Li, Y., *et al.*, Whole-genome sequencing reveals untapped genetic potential in Africa's indigenous cereal crop sorghum. *Nature communications* 2013, 4, 2320.
- [9] Zhou, Z., Jiang, Y., Wang, Z., Gou, Z., *et al.*, Resequencing 302 wild and cultivated accessions identifies genes related to domestication and improvement in soybean. *Nature biotechnology* 2015, 33, 408-414.
- [10] Qi, J., Liu, X., Shen, D., Miao, H., *et al.*, A genomic variation map provides insights into the genetic basis of cucumber domestication and diversity. *Nature genetics* 2013, 45, 1510-1515.
- [11] Araus, J. L., Cairns, J. E., Field high-throughput phenotyping: the new crop breeding frontier. *Trends in plant science* 2014, 19, 52-61.
- [12] Ali, Z., Abulfaraj, A., Idris, A., Ali, S., *et al.*, CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants. *Genome biology* 2015, 16, 238.
- [13] Baltes, N. J., Hummel, A. W., Konecna, E., Cegan, R., *et al.*, Conferring resistance to geminiviruses with the CRISPR–Cas prokaryotic immune system. *Nature Plants* 2015, 1, 15145.
- [14] Ji, X., Zhang, H., Zhang, Y., Wang, Y., Gao, C., Establishing a CRISPR–Cas-like immune system conferring DNA virus resistance in plants. *Nature Plants* 2015, 1, 15144.
- [15] Li, Z., Liu, Z.-B., Xing, A., Moon, B. P., *et al.*, Cas9-Guide RNA Directed Genome Editing in Soybean. *Plant physiology* 2015, 169, 960-970.
- [16] Upadhyay, S. K., Kumar, J., Alok, A., Tuli, R., RNA-Guided Genome Editing for Target Gene Mutations in Wheat. *G3-Genes Genomes Genetics* 2013, 3, 2233-2238.
- [17] Svitashv, S., Young, J. K., Schwartz, C., Gao, H., *et al.*, Targeted Mutagenesis, Precise Gene Editing, and Site-Specific Gene Insertion in Maize Using Cas9 and Guide RNA. *Plant physiology* 2015, 169, 931-945.
- [18] Lawrenson, T., Shorinola, O., Stacey, N., Li, C., *et al.*, Induction of targeted, heritable mutations in barley and Brassica oleracea using RNA-guided Cas9 nuclease. *Genome biology* 2015, 16, 258.
- [19] Wang, S., Zhang, S., Wang, W., Xiong, X., *et al.*, Efficient targeted mutagenesis in potato by the CRISPR/Cas9 system. *Plant Cell Reports* 2015, 34, 1473-1476.
- [20] Brooks, C., Nekrasov, V., Lippman, Z. B., Van Eck, J., Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant physiology* 2014, 166, 1292-1297.
- [21] Fan, D., Liu, T., Li, C., Jiao, B., *et al.*, Efficient CRISPR/Cas9-mediated Targeted Mutagenesis in Populus in the First Generation. *Scientific reports* 2015, 5.

- [22] Jia, H., Wang, N., Xcc-facilitated agroinfiltration of citrus leaves: a tool for rapid functional analysis of transgenes in citrus leaves. *Plant Cell Reports* 2014, 33, 1993-2001.
- [23] Bae, S., Park, J., Kim, J. S., Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics (Oxford, England)* 2014, 30, 1473-1475.
- [24] Lei, Y., Lu, L., Liu, H. Y., Li, S., *et al.*, CRISPR-P: a web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants. *Mol Plant* 2014, 7, 1494-1496.
- [25] Lee, J., Chung, J. H., Kim, H. M., Kim, D. W., Kim, H., Designed nucleases for targeted genome editing. *Plant biotechnology journal* 2015.
- [26] EFSA, Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed through cisgenesis and intragenesis. *EFSA Journal* 2012, 10, 33.
- [27] *Single nucleotide polymorphisms - methods and protocols*, Humana Press, New York, NY 2009.
- [28] ZKBS, [Stellungnahme der ZKBS zu neuen Techniken für die Pflanzenzüchtung](#), 2012.
- [29] Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., *et al.*, Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature biotechnology* 2014, 32, 947-951.
- [30] Li, T., Liu, B., Spalding, M. H., Weeks, D. P., Yang, B., High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nature biotechnology* 2012, 30, 390-392.
- [31] Clasen, B. M., Stoddard, T. J., Luo, S., Demorest, Z. L., *et al.*, Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant biotechnology journal* 2016, 14, 169-176.
- [32] Shukla, V. K., Doyon, Y., Miller, J. C., DeKolver, R. C., *et al.*, Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature* 2009, 459, 437-441.
- [33] Flachowsky, H., Hanke, M. V., Peil, A., Strauss, S. H., Fladung, M., A review on transgenic approaches to accelerate breeding of woody plants. *Plant Breeding* 2009, 128, 217-226.
- [34] Kumar, S., Bink, M. C. A. M., Volz, R. K., Bus, V. G. M., Chagné, D., Towards genomic selection in apple (*Malus × domestica* Borkh.) breeding programmes: Prospects, challenges and strategies. *Tree Genetics & Genomes* 2011, 8, 1-14.
- [35] McClure, K. A., Sawler, J., Gardner, K. M., Money, D., Myles, S., Genomics: a potential panacea for the perennial problem. *American Journal of Botany* 2014, 101, 1780-1790.
- [36] Myles, S., Improving fruit and wine: what does genomics have to offer? *Trends in Genetics* 2013, 29, 190-196.
- [37] van Nocker, S., Gardiner, S. E., Breeding better cultivars, faster: applications of new technologies for the rapid deployment of superior horticultural tree crops. *Horticulture Research* 2014, 1, 14022.
- [38] Yamagishi, N., Yoshikawa, N., Expression of FLOWERING LOCUS T from *Arabidopsis thaliana* induces precocious flowering in soybean irrespective of maturity group and stem growth habit. *Planta* 2011, 233, 561-568.
- [39] Park, D., Kim, D., Jang, G., Lim, J., *et al.*, Efficiency to Discovery Transgenic Loci in GM Rice Using Next Generation Sequencing Whole Genome Re-sequencing. *Genomics & informatics* 2015, 13, 81-85.
- [40] Sastry, K. S., *Seed-borne plant virus diseases*, 2013.
- [41] Martinez de Alba, A. E., Elvira-Matelot, E., Vaucheret, H., Gene silencing in plants: a diversity of pathways. *Biochimica et biophysica acta* 2013, 1829, 1300-1308.
- [42] Bologna, N. G., Voinnet, O., The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in *Arabidopsis*. *Annual review of plant biology* 2014, 65, 473-503.
- [43] Baulcombe, D. C., VIGS, HIGS and FIGS: small RNA silencing in the interactions of viruses or filamentous organisms with their plant hosts. *Current opinion in plant biology* 2015, 26, 141-146.
- [44] Xie, M., Zhang, S., Yu, B., microRNA biogenesis, degradation and activity in plants. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2015, 72, 87-99.
- [45] Rogers, K., Chen, X., Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *The Plant cell* 2013, 25, 2383-2399.
- [46] Voinnet, O., Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends in plant science* 2008, 13, 317-328.

- [47] Regina, A., Bird, A., Topping, D., Bowden, S., *et al.*, High-amylose wheat generated by RNA interference improves indices of large-bowel health in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, *103*, 3546-3551.
- [48] Davuluri, G. R., van Tuinen, A., Fraser, P. D., Manfredonia, A., *et al.*, Fruit-specific RNAi-mediated suppression of DET1 enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes. *Nature biotechnology* 2005, *23*, 890-895.
- [49] Yu, B., Lydiate, D. J., Young, L. W., Schafer, U. A., Hannoufa, A., Enhancing the carotenoid content of Brassica napus seeds by downregulating lycopene epsilon cyclase. *Transgenic research* 2008, *17*, 573-585.
- [50] Ali, N., Paul, S., Gayen, D., Sarkar, S. N., *et al.*, Development of low phytate rice by RNAi mediated seed-specific silencing of inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase gene (IPK1). *PLoS one* 2013, *8*, e68161.
- [51] Dubois, A. E., Pagliarini, G., Brouwer, R. M., Kollen, B. J., *et al.*, First successful reduction of clinical allergenicity of food by genetic modification: Mal d 1-silenced apples cause fewer allergy symptoms than the wild-type cultivar. *Allergy* 2015, *70*, 1406-1412.
- [52] Gilissen, L. J., Bolhaar, S. T., Matos, C. I., Rouwendal, G. J., *et al.*, Silencing the major apple allergen Mal d 1 by using the RNA interference approach. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2005, *115*, 364-369.
- [53] Peters, S., Imani, J., Mahler, V., Foetisch, K., *et al.*, Dau c 1.01 and Dau c 1.02-silenced transgenic carrot plants show reduced allergenicity to patients with carrot allergy. *Transgenic research* 2011, *20*, 547-556.
- [54] Gil-Humanes, J., Piston, F., Altamirano-Fortoul, R., Real, A., *et al.*, Reduced-gliadin wheat bread: an alternative to the gluten-free diet for consumers suffering gluten-related pathologies. *PLoS one* 2014, *9*, e90898.
- [55] Gil-Humanes, J., Piston, F., Tollefsen, S., Sollid, L. M., Barro, F., Effective shutdown in the expression of celiac disease-related wheat gliadin T-cell epitopes by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, *107*, 17023-17028.
- [56] Barro, F., Iehisa, J. C., Gimenez, M. J., Garcia-Molina, M. D., *et al.*, Targeting of prolamins by RNAi in bread wheat: effectiveness of seven silencing-fragment combinations for obtaining lines devoid of coeliac disease epitopes from highly immunogenic gliadins. *Plant biotechnology journal* 2016, *14*, 986-996.
- [57] Habben, J. E., Bao, X., Bate, N. J., DeBruin, J. L., *et al.*, Transgenic alteration of ethylene biosynthesis increases grain yield in maize under field drought-stress conditions. *Plant biotechnology journal* 2014, *12*, 685-693.
- [58] Pieczynski, M., Marczewski, W., Hennig, J., Dolata, J., *et al.*, Down-regulation of CBP80 gene expression as a strategy to engineer a drought-tolerant potato. *Plant biotechnology journal* 2013, *11*, 459-469.
- [59] Waltz, E., Beating the heat. *Nat Biotech* 2014, *32*, 610-613.
- [60] Wang, Y., Beath, M., Chalifoux, M., Ying, J., *et al.*, Shoot-specific down-regulation of protein farnesyltransferase (alpha-subunit) for yield protection against drought in canola. *Mol Plant* 2009, *2*, 191-200.
- [61] Antony, G., Zhou, J., Huang, S., Li, T., *et al.*, Rice xa13 recessive resistance to bacterial blight is defeated by induction of the disease susceptibility gene Os-11N3. *The Plant cell* 2010, *22*, 3864-3876.
- [62] Scorza, R., Callahan, A., Dardick, C., Ravelonandro, M., *et al.*, Genetic engineering of Plum pox virus resistance: 'HoneySweet' plum-from concept to product. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 2013, *115*, 1-12.
- [63] Aragao, F. J., Faria, J. C., First transgenic geminivirus-resistant plant in the field. *Nature biotechnology* 2009, *27*, 1086-1088; author reply 1088-1089.
- [64] Aragao, F. J., Nogueira, E. O., Tinoco, M. L., Faria, J. C., Molecular characterization of the first commercial transgenic common bean immune to the Bean golden mosaic virus. *J Biotechnol* 2013, *166*, 42-50.
- [65] Xu, L., Duan, X., Lv, Y., Zhang, X., *et al.*, Silencing of an aphid carboxylesterase gene by use of plant-mediated RNAi impairs Sitobion avenae tolerance of Phoxim insecticides. *Transgenic research* 2014, *23*, 389-396.
- [66] Niu, J., Jian, H., Xu, J., Chen, C., *et al.*, RNAi silencing of the Meloidogyne incognita Rpn7 gene reduces nematode parasitic success. *European Journal of Plant Pathology* 2012, *134*, 131-144.

- [67] Steeves, R. M., Todd, T. C., Essig, J. S., Trick, H. N., Transgenic soybeans expressing siRNAs specific to a major sperm protein gene suppress *Heterodera glycines* reproduction. *Functional Plant Biology* 2006, *33*, 991-999.
- [68] Youssef, R. M., Kim, K. H., Haroon, S. A., Matthews, B. F., Post-transcriptional gene silencing of the gene encoding aldolase from soybean cyst nematode by transformed soybean roots. *Experimental parasitology* 2013, *134*, 266-274.
- [69] Cheng, W., Song, X. S., Li, H. P., Cao, L. H., *et al.*, Host-induced gene silencing of an essential chitin synthase gene confers durable resistance to Fusarium head blight and seedling blight in wheat. *Plant biotechnology journal* 2015, *13*, 1335-1345.
- [70] Koch, A., Kumar, N., Weber, L., Keller, H., *et al.*, Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14 α -demethylase-encoding genes confers strong resistance to Fusarium species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, *110*, 19324-19329.
- [71] Nowara, D., Gay, A., Lacomme, C., Shaw, J., *et al.*, HIGS: host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. *The Plant cell* 2010, *22*, 3130-3141.
- [72] Sherman, J. H., Munyikwa, T., Chan, S. Y., Petrick, J. S., *et al.*, RNAi technologies in agricultural biotechnology: The Toxicology Forum 40th Annual Summer Meeting. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP* 2015, *73*, 671-680.
- [73] Parisi, C., Tillie, P., Rodriguez-Cerezo, E., The global pipeline of GM crops out to 2020. *Nature biotechnology* 2016, *34*, 31-36.
- [74] EFSA, International scientific workshop 'Risk assessment considerations for RNAi-based GM plants'. 2014, *EN-705*.
- [75] Ramon, M., Devos, Y., Lanzoni, A., Liu, Y., *et al.*, RNAi-based GM plants: food for thought for risk assessors. *Plant biotechnology journal* 2014, *12*, 1271-1273.