

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

Zusammenfassung





**Universität für Bodenkultur Wien**

## **Impressum**

### **Eigentümer, Herausgeber und Verleger**

Bundesministerium für Gesundheit und Frauen (BMGF)  
Radetzkystraße 2, 1030 Wien  
[www.bmgf.gv.at](http://www.bmgf.gv.at)

### **Autorinnen und Autoren**

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

Diese Zusammenfassung sowie der gesamte Bericht stehen zum Download auf der Website des BMGF unter [www.bmgf.gv.at](http://www.bmgf.gv.at) im Bereich Gentechnik zur Verfügung.

### **Erscheinungsdatum**

März 2017

---

# Pflanzenzüchtung

Das Ziel der Pflanzenzüchtung ist die Bereitstellung von Sorten, die die Bedürfnisse des Menschen abdecken [1]: Zuchtziele beinhalten abiotische und biotische Stresstoleranz, erhöhten Ertrag und Ertragsstabilität, aber auch die Entwicklung von Sorten mit verändertem Gehalt an Inhaltsstoffen für Zwecke in der Lebens- und Futtermittelproduktion oder für technische Anwendungen.

Ein zentraler Vorgang in der Züchtung ist die Kreuzung zweier aufgrund ihrer Eigenschaften ausgewählter Individuen einer Art oder kreuzbarer Arten, aus welcher Nachkommen mit neu kombinierten Eigenschaften erhalten werden. Die unterschiedlichen Eigenschaften der einzelnen Pflanzen basieren auf genetischen Unterschieden (genetischer Variation).

Das 20. Jahrhundert brachte Techniken, die den Zuchtprozess und die Sortenentwicklung unterstützen. Mutagenese ist eine Methode der Erzeugung von neuer genetischer Variation, die zu möglichen neuen nutzbaren Eigenschaften führen kann. Induktion von Polyploidie, das heißt der Verdoppelung des Chromosomensatzes, kann zum Beispiel zu Sorten mit erhöhter Biomasse führen. Andere Methoden erleichtern die Kombination von Genomen, wie Techniken basierend auf der Protoplastenfusion. Schließlich ist es seit den 80er Jahren des vorigen Jahrhunderts möglich Pflanzen mit gewählten zusätzlichen genetischen Sequenzen zu transformieren (transgene Pflanzen). Diese und andere biotechnologische Methoden können also verwendet werden, um genetische Variation in Pflanzen zu erhöhen oder zu kombinieren und so entstandene Pflanzen können als Basis für die Züchtung und Sortenentwicklung verwendet werden.

## Neue Pflanzenzüchtungstechniken

Die Richtlinie 2001/18/EG reguliert die Freisetzung von genetisch veränderten Organismen (GVO) und das Inverkehrbringen von GVOs als Produkt oder in Produkten in der EU. Die Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 enthält Bestimmungen für genetisch veränderte Lebens- und Futtermittel. Die legale Definition eines GVO (im Allgemeinen Sprachgebrauch „transgener Organismus“), der unter diese Bestimmungen fällt, Ausnahmen (z.B. Mutagenese) und nicht unter die Definition fallende Techniken (z.B. Polyploidie-Induktion), sind in der Richtlinie 2001/18/EG festgesetzt. Fortschritte in der Forschung und Entwicklung brachten nun vermehrt Stakeholder Anfragen an zuständige Behörden in den EU Mitgliedsstaaten, ob bestimmte Techniken oder bestimmte aus ihnen resultierende Pflanzen unter die legale GVO Definition fallen. Zu den 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 [2]).

## Bericht über Neue Pflanzenzüchtungstechniken (NPBT) an das Gesundheitsministerium

Im Auftrag des Bundesministeriums für Gesundheit wurden einige der genannten NPBTs in Studien der AGES (Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit) behandelt [3, 4]; CRISPR-Cas basiertes Genom-Editieren und die beschleunigte Züchtung sind relative neue Entwicklungen, über die nun in einer weiteren Studie berichtet wurde. Weiters wurden neuere Entwicklungen im Bereich der RNA-abhängigen Methoden (in einer Anwendung, die zu GVOs führt) ebenfalls behandelt, vor allem auch wegen ihres Potentials in der Herstellung von Pflanzen mit Resistenzeigenschaften gegen Pflanzenpathogene.

Die Studie 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.

---

# Kurzbeschreibung der Transgenetik und der wichtigsten neuen Pflanzenzuchtverfahren

Informationen und Abbildung 1 erweitert aus „Neue Züchtungstechniken: Gentechnik – oder doch keine Gentechnik?“, Der Pflanzenarzt 4/2016, Seite 24.

## Transgenetik

In der Transgenetik werden ein oder mehrere artfremde Gene in das Genom eines Empfängerorganismus eingebracht. Dies geschieht entweder mit Hilfe von Agrobakterien, die auch im Zuge des natürlichen Infektionsprozesses einen Teil ihrer DNA in den Zellkern der Pflanzen einschleusen, oder durch direktes Einbringen von DNA Segmenten, zum Beispiel durch Beschuss mit Mikro-Partikeln.

Der Integrationsort im Genom konnte bisher nicht gezielt gewählt werden, sondern wurde nach erfolgter Integration identifiziert. Einige der neuen Züchtungsmethoden machen es nun möglich Transgene an einem vorher bestimmten Ort im Genom zu insertieren.

## RNA-abhängige Techniken

Mit der RNAi-Technik (RNA Interferenz) veränderte Pflanzen fallen unter die Definition eines GVO nach der Richtlinie 2001/18/EG. Diese tragen ein Transgen, das für ein RNA-Molekül kodiert, welches die Genexpression eines weiteren Gens beeinflusst und so eine bestimmte Eigenschaft der Pflanze verändert. RNAi-basierte GV Pflanzen waren unter den ersten kommerziell entwickelten Pflanzen (FlavrSavr Tomate). Zur Zeit basieren jedoch die meisten auf dem Markt befindlichen GV Pflanzen auf der Expression eines oder mehrerer Transgene, die für ein Protein kodieren, das die gewünschte Eigenschaft überträgt. RNAi-basierte Anwendungen rücken nun aber wieder in den Mittelpunkt, vor allem wegen ihres Potentials in der Herstellung von Pflanzen mit Resistenzeigenschaften gegen Pflanzenpathogene. Auf EU Ebene findet durch die EFSA (Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit) zur Zeit ein Prozess statt, der zum Ziel hat, die Risikobewertung von RNAi-basierten GV Pflanzen zu evaluieren und anhand der Ergebnisse die Risikobewertung zu adaptieren. Eine Risikobewertung ist integraler Bestandteil des GVO-Zulassungsverfahrens.

## Neue Züchtungstechnologien

### Cisgenetik – Intragenetik

Bei diesen Techniken werden Gene von derselben oder einer kreuzungskompatiblen Art in das Genom eines Empfängerorganismus eingebracht. Während bei der Intragenese die Regulationssequenzen und die für das eigentliche Protein kodierende Sequenz aus verschiedenen Genen und/oder von verschiedenen

---

Donororganismen sein können - also neu kombiniert, verwendet die Cisgenetik ein komplettes nicht-rekombiniertes Gen.

## **Genom-Editierungsverfahren**

### **Oligonukleotid-gesteuerte Mutagenese (ODM)**

Kurze DNA Stücke werden in Zellen eingebracht, interagieren aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit mit dem Zielort und führen zu Mutationen an einem gewünschten Ort im Genom, ohne selbst eingebaut zu werden. Mit dieser Technik können am Zielort –genauso wie bei natürlichen Mutationen- kurze DNA-Sequenz-Verluste oder kurze Insertionen zelleigener DNA hergestellt werden, sowie gezielte Austausch von einzelnen Nukleotiden, die zu geänderten Proteinen führen, vorgenommen werden.

### **Zielgerichtete Nuklease-Techniken (SDN)**

Mit diesen Methoden ist es möglich, in Genen von Interesse gezielt Mutationen zu erzeugen oder zusätzliche DNA Segmente (z.B. Cis-, Intra-, oder Transgene) an einem bestimmten Ort im Genom zu insertieren (SDN3 Technik). Die erzeugten Mutationen können gezielt Gene ausschalten (SDN1), oder, ähnlich der ODM Technik, zu veränderten Proteinen führen (SDN2). Mittlerweile gibt es verschiedene Nucleasen, die verwendet werden können (TALEN, ZFN, CRISPR-Cas9). Diese werden entweder direkt als Protein, oder in Form von DNA in Zellen eingebracht, wo sie an den gewählten Zielorten zu DNA Brüchen führen. Zelleigene Reparatursysteme fügen die DNA Enden wieder zusammen, wobei Mutationen entstehen können. Mit der SDN1 und SDN2 Technik ist es möglich, gewünschte Mutationen in Pflanzen zu erzeugen, die sich nicht von natürlichen Mutationen unterscheiden.

## **Pfropfen unter Verwendung einer gentechnisch veränderten Pflanze**

Beim Pfropfen werden die Eigenschaften zweier Sorten kombiniert, indem man einem Wurzelstock den Spross einer Edelsorte anfügt. Als Pfropfpartner kann eine gentechnisch veränderte Pflanze oder eine durch die neuen Züchtungstechnologien erhaltene Pflanze verwendet werden, die gewünschte Eigenschaften trägt.

## **Reverse Züchtung**

Reverse Züchtung beschreibt eine Methode, mit der neue Eltern einer vorhandenen F1 Hybride hergestellt werden können. Diese können dann die F1 Hybride in beliebiger Menge produzieren. Dazu werden transgene Pflanzen im Kreuzungsprozess verwendet, die in der F1 Hybride die Rekombination unterdrücken. Die neuen Elternpflanzen können so gewählt werden, dass sie das Transgen nicht mehr besitzen.

---

## Beschleunigte Züchtung

Bei der beschleunigten Züchtung werden bei Kultursorten mit langer Generationsfolge (z.B. Bäume) transgene Kreuzungspartner hergestellt, die eine verkürzte Generationszeit aufweisen. So konnte beim Apfel die Generationszeit auf ein Jahr verkürzt werden. Dies erlaubt es, Züchtungsprogramme, die zum Beispiel das Einkreuzen von Resistenzgenen aus verwandten Arten zum Ziel haben, zu verkürzen. Das Transgen wird zu einem geeigneten Zeitpunkt eingekreuzt, sodaß die erstellte Sorte die gewünschten Eigenschaften, aber nicht das Transgen enthält.

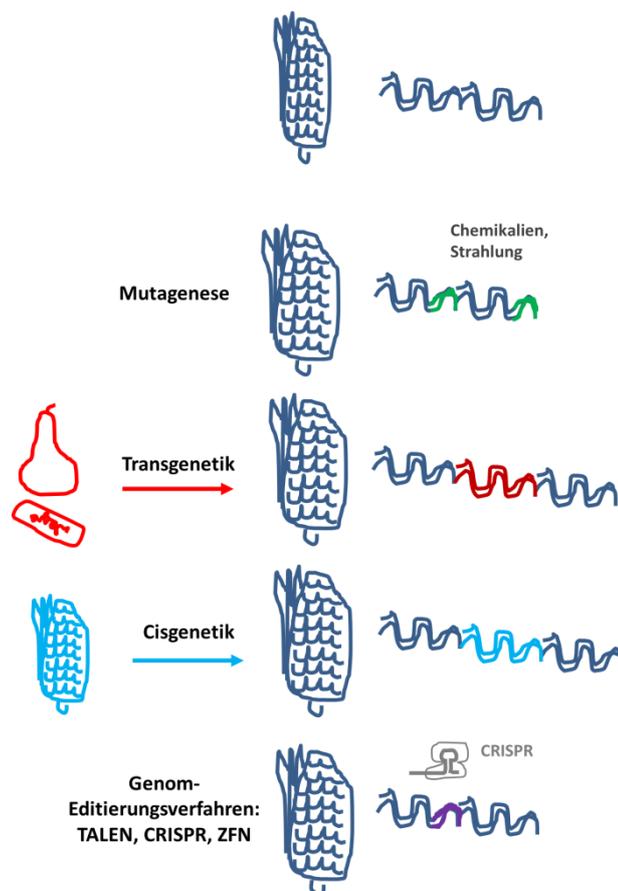


Abbildung 1. Vereinfachte Darstellung des Konzepts ausgewählter neuer Pflanzenzüchtungsverfahren (Cisgenetik, Genom-Editierungsverfahren) im Vergleich zur Mutagenese und Transgenetik (erweitert aus „Neue Züchtungsmethoden: Gentechnik – oder doch keine Gentechnik?“, Der Pflanzenarzt 4/2016, Seite 24). Veränderungen am Genom der Pflanzen sind schematisch farblich dargestellt. Bei der Transgenetik und der Cisgenetik werden zusätzliche DNA Sequenzen eingebracht, bei der Mutagenese und den Genom-Editierungsverfahren werden Mutationen im Genom verursacht. Bei der Mutagenese treten diese an mehreren, zufälligen Orten im Genom auf, bei Genom-Editierungsverfahren kann der Ort im Genom, an dem die Mutation entstehen soll, vorher bestimmt werden.

---

# Referenzen

[1] Becker, H., *Pflanzenzüchtung*, Ulmer, Stuttgart 2011.

[2] Lusser M, Parisi C, Plan D, E, R.-C., *New plant breeding techniques*, Joint Research Centre — Institute for Prospective Technological Studies, Luxemburg 2011.

[3] AGES, *Cisgenesis - A report on the practical consequences of the application of novel techniques in plant breeding*, Bundesministerium für Gesundheit, Wien 2012.

[4] AGES, *New plant breeding techniques. RNA-dependent methylation, Reverse breeding, Grafting*, Bundesministerium für Gesundheit, Wien 2013.